

FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON TEMPERATUR AUF DEN ZILIÄREN TRANSPORT IN DER TRACHEA VON MÄUSEN

Claudio David Marquardt

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN ZUM
EINFLUSS VON TEMPERATUR AUF DEN
ZILIÄREN TRANSPORT IN DER TRACHEA
VON MÄUSEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Claudio David Marquardt

aus Würzburg

Gießen 2015

**Aus der der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen**

**Kommissarischer Leiter der Abteilung:
Prof. Dr. med. Michael Henrich D.Phil.**

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Henrich D. Phil.

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Heiß

Tag der Disputation: 06.08.2015

Meiner Familie

Inhalt

1	Einleitung	6
1.1	Anatomie der Trachea	6
1.2	Die mukoziliäre Clearance	8
1.2.1	Das Trachealsekret	9
1.2.2	Morphologie der Kinozilien	11
1.2.3	Ablauf des Kinozilienschlags	16
1.2.4	Koordination des Kinozilienschlags	18
1.2.5	Einflussfaktoren auf die mukoziliäre Clearance	20
1.3	Steuerung der ziliären Funktion	21
1.3.1	Zustandsformen ziliärer Aktivität	22
1.3.2	Einfluss von cAMP auf die ziliäre Aktivität	24
1.3.3	Einfluss von cGMP auf die ziliäre Aktivität	26
1.3.4	Einfluss von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen auf die ziliäre Aktivität	27
1.3.5	Regulationsmechanismen zur Steuerung der ziliären Aktivität	32
1.3.6	Einfluss von Temperatur auf die ziliäre Aktivität	35
1.4	Fragestellung der Arbeit	37
2	Material und Methoden	38
2.1	Versuchstiere und Organentnahme	38
2.2	Versuchsvorbereitung	39
2.2.1	Bodenbeschichtung der Delta-T-Kulturschälchen	39
2.2.2	Herstellung der HEPES-Ringer-Pufferlösung	39
2.2.3	Herstellung von Stammlösungen	40
2.3	Der Messstand	40
2.4	Vorversuche	42
2.5	Allgemeines Versuchsprotokoll	44
2.6	Versuche zur KSF	46
2.6.1	Messung der KSF	46
2.6.2	Versuche zur Temperaturabhängigkeit der KSF	46
2.7	Versuche zur PTG	46
2.7.1	Messung der PTG	46
2.7.2	Versuche zur Temperaturabhängigkeit der PTG und zur ziliären Grundaktivität	47
2.8	Digitale Auswertung	49
2.8.1	Digitale Auswertung der Versuche zur PTG	49
2.8.2	Digitale Auswertung der Versuche zur KSF	50

2.9	Auswertung der Versuche und Statistik	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Temperaturabhängigkeit der KSF	53
3.2	Temperaturabhängigkeit der PTG	55
3.2.1	Auswirkung einer passageren Temperaturniedrigung auf 22 °C bzw. 26 °C auf die PTG	55
3.2.2	Auswirkung einer passageren einmaligen Temperaturerhöhung auf 34 °C, 37 °C bzw. 41 °C auf die PTG	56
3.2.3	Auswirkung einer wiederholten passageren Temperaturerhöhung auf 41 °C auf die PTG	60
3.3	Auswirkungen einer Ca ²⁺ -freien Lösung und Chelatierung intrazellulärer Ca ²⁺ -Ionen auf die PTG	62
3.3.1	Auswirkungen auf die ziliäre Grundaktivität	62
3.3.2	Auswirkungen auf die temperaturabhängigen Veränderungen der PTG ..	63
4	Diskussion	66
4.1	Methode zur Messung der ziliären Transportleistung	66
4.2	Temperaturabhängigkeit der ziliären Transportleistung	69
4.3	Der Einfluss einer Ca ²⁺ -freien Lösung und Chelatierung intrazellulärer Ca ²⁺ -Ionen auf die ziliäre Grundaktivität.....	71
4.4	Der Einfluss einer Ca ²⁺ -freien Lösung und Chelatierung intrazellulärer Ca ²⁺ -Ionen auf die Temperaturabhängigkeit der PTG	73
4.5	Schlussfolgerung	76
5	Zusammenfassung	78
6	Summary	80
7	Abkürzungsverzeichnis	81
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	83
9	Literaturverzeichnis.....	84
10	Ehrenwörtliche Erklärung	98
11	Danksagung	99
12	Curriculum vitae.....	100

1 Einleitung

Pro Tag passieren in Abhängigkeit von der Körpergröße und der körperlichen Aktivität zwischen 1000 und 21000 l Luft die menschlichen Atemwege (Wanner et al. 1996). Dieses große Ventilationsvolumen veranschaulicht die Vielzahl potentiell schädlicher Fremdstoffe, denen der Respirationstrakt während der Atmung ausgesetzt ist.

Zu seinem Schutz haben sich zahlreiche verschiedene Abwehr- und Reinigungsmechanismen entwickelt. Zum einen bildet das Trachealsekret eine mechanische, chemische, biologische und immunologische Barriere gegenüber eingedrungenen Fremdstoffen. Zum anderen ist der Trachealbaum bis zu den Bronchioli terminales über seine gesamte Länge von einem Kinozilien-tragenden Epithel ausgekleidet. Dieses respiratorische Flimmerepithel hat die Aufgabe, im Trachealsekret gelöste Fremdstoffe durch einen gerichteten Kinozilienschlag kehlkopfwärts abzutransportieren. Die Kinozilienschlagfrequenz (KSF) unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren und kann an sich verändernde Umweltbedingungen angepasst werden, die einen erhöhten Sekrettransport aus den Atemwegen notwendig machen. Neben inhalativen Noxen, wie z. B. Zigarettenrauch oder Stickstoffdioxid, haben auch Veränderungen des physiologischen Umgebungsmilieus, z. B. Veränderungen der Umgebungstemperatur, Auswirkungen auf die Funktion und Effizienz des mukoziliären Apparats (Wanner et al. 1996, Chilvers et al. 2000). Die zellulären Mechanismen, die bei der Regulation der ziliären Funktion eine Rolle spielen, werden in der Literatur kontrovers diskutiert.

1.1 Anatomie der Trachea

Histologisch lässt sich der Wandaufbau der Trachea von luminal nach basal in 3 Schichten unterteilen:

- Die Tunica mucosa,
- Die Tunica fibromusculocartilaginea,
- Die Tunica adventitia.

Die Tunica mucosa bildet die luminale Grenzschicht der Trachea und steht in direktem Kontakt mit dem Trachealsekret, das das Innere der Trachea auskleidet. Die sich nach außen anschließende Tunica fibromusculocartilaginea enthält beim Menschen 16-20 hufeisenförmige Spangen aus hyalinem Knorpel, die Cartilagines tracheales. Diese sind

in Längsrichtung untereinander durch kollagenes Bindegewebe, die Ligamenta anularia, verbunden. Am dorsalen Abschnitt der Trachea ist diese Schicht knorpelfrei und enthält eine Bindegewebs-Muskel-Platte, die *Paries membranaceus* mit dem *Musculus trachealis*. Die *Tunica adventitia* baut die Trachea abschließend beweglich in das umgebende Bindegewebe von Hals und Mediastinum ein (Drenckhahn 2003, Welsch 2003). Der prinzipielle Aufbau der Trachea der Maus entspricht dem des Menschen, ihre Länge beträgt nur circa 0,5 cm.

Die *Tunica mucosa* setzt sich von basal nach apikal aus der *Lamina propria*, der Basalmembran und der *Lamina epithelialis* zusammen. Die *Lamina epithelialis* der *Tunica mucosa* ist ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel. Neben Kinozilientragenden Zellen finden sich dort v. a. sekretorische Zellen, aber auch intermediäre Zellen, Basalzellen, vereinzelt Mikrovilli-tragende Bürstenzellen und endokrine Zellen. (Drenckhahn 2003, Welsch 2003, siehe Abbildung 1). Neben dem geordneten Kinozilienschlag erfüllt das Epithel der Atemwege weitere Aufgaben. So moduliert es die Zusammensetzung des Trachealsekrets, produziert antibakterielle Peptide und erhöht die mechanische Stabilität der Trachea. Kinozilientragende und sekretorische Zellen sind dabei funktionell eng miteinander verknüpft. Dies zeigt sich beispielsweise an der Wirkung verschiedener parakriner Botenstoffe, wie z. B. Adenosintriphosphat (ATP) und Acetylcholin (ACh), die einerseits einen stimulierenden Einfluss auf die ziliäre Aktivität besitzen und andererseits zusätzlich die Zusammensetzung und Menge des Trachealsekrets beeinflussen (Tong et al. 2013, Wanner et al. 1996).

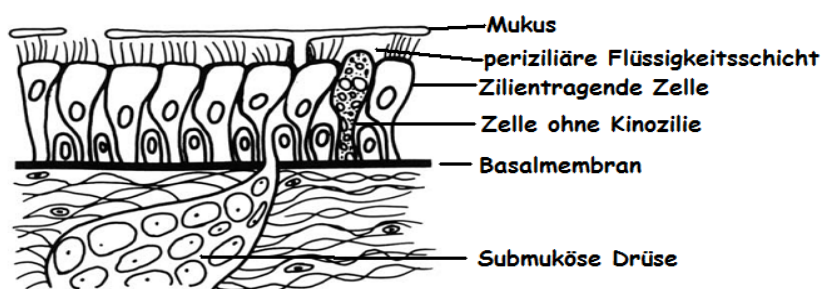


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der *Tunica mucosa* des Trachealepithels (Wanner et al. 1996).

Die *Tunica mucosa* bildet die luminale Grenzschicht der Trachea und setzt sich von basal nach apikal aus der *Lamina propria*, in der sich v. a. submuköse Drüsen befinden, der Basalmembran und der *Lamina epithelialis* zusammen. Neben Kinozilientragenden Zellen finden sich in der *Lamina epithelialis* v. a. sekretorische Zellen aber auch intermediäre Zellen und Basalzellen sowie vereinzelt Mikrovilli-tragende Bürstenzellen und endokrine Zellen. Die *Lamina epithelialis* der *Tunica mucosa* steht in direktem Kontakt mit dem Trachealsekret, welches das Innere der Trachea auskleidet und sich aus einer periziliären Flüssigkeitsschicht (Solphase) und einer mukösen Gelphase zusammensetzt.

1.2 Die mukoziliäre Clearance

Während der Atmung inhalierte und in den Lungen und Atemwegen deponierte Pathogene sowie Umweltschadstoffe werden vornehmlich über drei verschiedene Mechanismen aus der Lunge entfernt. Die mukoziliäre Clearance entfernt Fremdstoffe, die sich in den Atemwegen abgesetzt haben. Unter mukoziliärer Clearance versteht man dabei den kehlkopfwärts gerichteten Transport von Mukus und darin gelösten Fremdstoffen mittels eines koordinierten Kinozilenschlags (siehe Kapitel 1.2.4). Im Oropharynx angekommen werden die transportierten Fremdstoffe entweder abgehustet oder geschluckt (Knowles et al. 2002). Unabhängig vom Kinozilenschlag, kann der Mukoziliartransport noch durch aktives Husten unterstützt werden. Die alveoläre Clearance beschreibt die Elimination unlöslicher Partikel, die sich in den Lungenalveolen abgelagert haben, u. a. durch Phagozytose (Sleigh et al. 1988, Houtmeyers et al. 1999). Bei der Untersuchung der mukoziliären Clearance und ihrer Bestandteile ist die Wahl der zu verwendenden Messmethode von zentraler Bedeutung. Die mukoziliäre Clearance wird im Wesentlichen bestimmt durch die Eigenschaften der Kinozilien und durch die Zusammensetzung des Trachealsekrets, die für seine rheologischen Eigenschaften verantwortlich ist (Satir et al. 1990). Um die verschiedenen Aspekte des Mukoziliartransportes zu untersuchen, wurde in den vergangenen Jahrzehnten eine Vielzahl unterschiedlicher Forschungsansätze entwickelt. Die Verwendung verschiedener Modellorganismen und die Vielzahl unterschiedlicher Messmethoden führen dabei häufig zu Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit und Interpretation der unterschiedlichen, teilweise sogar konträren Forschungsergebnisse. Unser jetziges Verständnis der Mukoziliarfunktion verdanken wir v. a. der Arbeit mit Modellorganismen wie *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Chlamydomonas* und neuerdings auch *Caenorhabditis elegans*, die nicht notwendigerweise die komplexeren Verhältnisse bei Säugetieren widerspiegeln (Satir et al. 2007).

Im Prinzip kann die ziliäre Transportfunktion auf zwei Arten untersucht werden. Erstens durch die direkte Beobachtung der Flimmeraktivität des Trachealepithels (KSF), zweitens durch Prüfung des durch die Flimmertätigkeit geleisteten Stofftransportes (Irvani 1967). Die Messung der KSF kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Zu den verwendeten Methoden zählten in der Vergangenheit v. a. stroboskopische Messungen, die Photonenkorrelationsspektroskopie und neuerdings die Video-Mikroskopie (Trindade et al. 2007), die sehr genaue Messungen der KSF, auch bei hohen Schlagfrequenzen,

ermöglicht (Lansley et al. 1999). Hussong et al. (2008) entwickelten erste μ PIV-Messungen (Micro Particle Imaging Velocimetry) mit denen sie ex vivo die Transportgeschwindigkeiten von Partikeln in der Mukus-depletierten Trachea von Mäusen bestimmen konnten. Durch Messung der Partikeltransportgeschwindigkeit (PTG) können Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen Veränderungen der KSF und dem resultierenden effektiven Sekrettransport gezogen werden und so die physiologische Relevanz einer Veränderung der KSF beurteilt werden.

1.2.1 Das Trachealsekret

Das Trachealsekret kleidet das Innere der Trachea aus. Es fungiert als mechanische, chemische, biologische und immunologische Barriere gegenüber eingedrungenen Fremdkörpern. Inhalierte Partikel haften dem Trachealsekret an und werden durch den geordneten Kinozilenschlag kehlkopfwärts transportiert, während antioxidative Substanzen und Entzündungszellen sowie humorale Abwehrstoffe die deponierten Fremdstoffe angreifen (Chilvers et al. 2000).

Das Trachealsekret setzt sich aus verschiedenen Komponenten unterschiedlicher Quellen zusammen und ist eine Mischung aus Alveolarflüssigkeit, Serumtranssudat sowie den Sekretionsprodukten von Zellen im Epithel der Atemwege und der seromukösen Glandulae tracheales der Lamina propria (Satir et al. 1990, Boat et al. 1994). Bei den sekretorischen Zellen im Epithel der Atemwege werden Mukus-sezernierende Becherzellen von Clara-Zellen und serösen Zellen unterschieden, die ein wässriges niedervisköses Sekret produzieren (Chilvers et al. 2000). Die Mukus-produzierenden Zellen liegen verstreut und stellen circa 20% an der Gesamtzahl der Zellen in den Atemwegen dar. Im Verlauf von den größeren proximalen zu den kleineren distalen Atemwegen nimmt die Anzahl Kinozilien-tragender sowie Mukus-produzierender Becherzellen stetig ab, während der Anteil an Clara-Zellen und serösen Zellen stetig ansteigt (Wanner et al. 1996).

Strukturell unterteilt man das Trachealsekret in 2-3 mehr oder weniger klar voneinander abgrenzbare Schichten, die sich bezüglich ihrer Viskosität voneinander unterscheiden. Epithelnah und periziliär befindet sich die niedervisköse Sol- oder Hypophase. Darüber schließt sich eine höhervisköse muköse Schicht, die sog. Gel- oder Epiphase an. Diskutiert wird die Existenz einer dritten lipophilen Schicht. Diese könnte als Schmierfilm zwischen Sol- und Gelphase liegen und so zum Schutz des Epithels

beitragen. An der Luft-Flüssigkeits-Grenze befindet sich zudem ein Surfactant-Film, der die Oberflächenspannung reduziert, sodass abgelagerte Partikel leichter benetzt und in tiefere Flüssigkeitsphasen disloziert werden können (Yoneda 1976, Gehr et al. 1996).

Die Gelphase setzt sich aus Makromolekülen, wie Glykoproteinen (2-3%) und Proteoglykanen, Salzen (1%) sowie hauptsächlich Wasser (95%) zusammen. Die Konzentration an Makromolekülen bestimmt die Viskosität und damit die rheologischen Eigenschaften der Gelphase (Kim et al. 1997). Die Muzine bestehen aus einem Proteinkern mit zahlreichen unterschiedlich glykosylierten Seitenketten. Diese Oligosaccheridseitenketten machen circa 70-80% des Gesamtgewichts der Muzine aus und besitzen vielfältige Bindungsstellen, v. a. für Mikroorganismen (Lamblin et al. 1992). Die Muzine werden intrazellulär in kondensierter Form gespeichert und erst nach Exozytose, die u. a. durch die Ablagerung von Partikeln auf dem Trachealepithel stimuliert wird, hydriert (Spungin et al. 1984, Verdugo 1991). Die Gelphase befeuchtet und schützt die Atemwege und dient als Filtrations- und Diffusionsbarriere. Inhalierte Partikel bleiben an den Oligosaccheridseitenketten der Muzine haften und werden von antibakteriellen Proteinen, u. a. Lysozymen, Antiproteasen und Immunglobulinen (v. a. IgA), sowie von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen angegriffen, während sie durch den Kinozilienschlag rachenwärts abtransportiert werden (Chilvers et al. 2000).

Die wässrige Solphase ist eine leicht hypoosmolare Flüssigkeit (Wanner et al. 1996). Neben einem hohen Wasseranteil von > 90% enthält sie Ionen, Proteine, Proteoglykane und Lipide (Robinson et al. 1989). Ihre Höhe beträgt zwischen 5–10 µm und entspricht damit ungefähr der Länge eines Kinoziliums. Sie wird mittels aktiven Ionentransports über die Membran des ziliären Epithels hinweg durch Osmose reguliert (Chilvers et al. 2000, Smith et al. 2008). Die Solphase verhindert das Aneinanderhaften von epithelialen Muzinen mit denen der darüber liegenden Gelphase und ermöglicht durch ihre geringe Viskosität einen schnellen Kinozilienschlag (Smith et al. 2008). Uneinigkeit in der Literatur besteht darüber, inwiefern Gel- und Solphase voneinander abgrenzbar sind. Neben der strikten Trennung in Gel- und Solphase, als zwei voneinander abgrenzbare Schichten, gibt es auch Modelle, denen zufolge die Muzine ein vernetztes Gel bilden, das gegen die Oberfläche hin in konzentrierter und gegen das Epithel hin, bedingt durch Ionen- und Wassertransport über das Epithel hinweg, in verdünnter Form vorliegt (Verdugo 1991). Ebenfalls ungeklärt ist, ob sich die Gelphase kontinuierlich über den gesamten Respirationstrakt ausbreitet oder ob der Mukus nur diskontinuierlich die Solphase bedeckt (Chilvers et al. 2000). Da die Sekretion des Mukus erst nach

Stimulation durch die Ablagerung von Partikel in den Atemwegen erfolgt, könnte, aufgrund der Vielzahl an möglicher Stimulantien in den größeren Atemwegen, der Mukus dort kontinuierlich ausgebreitet sein, wohingegen er in den kleineren Atemwegen, bedingt durch eine geringere Anzahl eindringender Partikel, nur diskontinuierlich das Epithel bedeckt (Sleigh et al. 1988, siehe Abbildung 2).

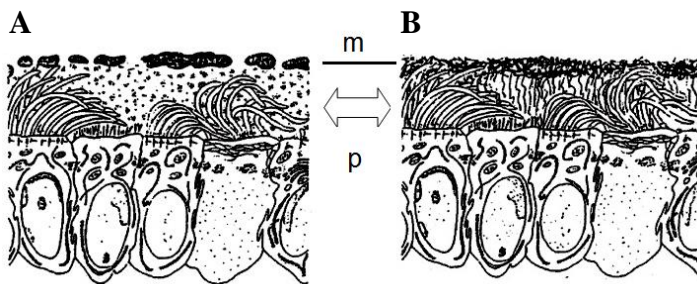


Abbildung 2:
Schematische Darstellung des Aufbaus des Trachealsekrets (Houtmeyers et al. 1999).

A: Nach konventioneller Vorstellung bedeckt der Mukusfilm (m) die periziliäre Flüssigkeitsschicht (p).
B: Der Mukus bildet ein verzweigtes Netzwerk, das die gesamte Höhe des Trachealsekrets durchspannt, jedoch von luminal nach basal in seiner Konzentration abnimmt.

1.2.2 Morphologie der Kinozilien

Bei Kinozilien handelt es sich um spezielle Ausstülpungen des apikalen Zellpols, die sich auf der Oberfläche vieler eukaryontischer Zellen befinden (Houtmeyers et al. 1999, Satir et al. 2007). In der Trachea trägt der Großteil der epithelialen Zellen an seiner Oberfläche Kinozilien (56%), lediglich kleinere Areale bis 1 mm Durchmesser sind frei von Kinozilien (Alexander et al. 1975, Serafini et al. 1977). Auf ihrer Oberfläche tragen Kinozilien-tragende Zellen neben zahlreichen Mikrovilli zwischen 50 und 200 Kinozilien mit einer Länge von circa 5-10 μm und einem Durchmesser von 0,1-0,2 μm (Houtmeyers et al. 1999, Trindade et al. 2007, siehe Abbildung 3).

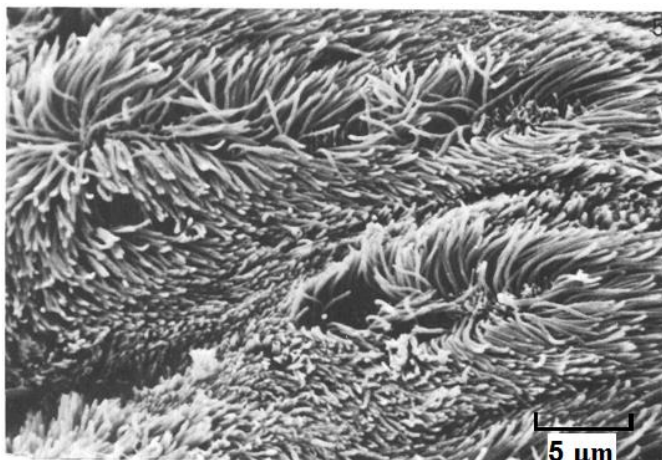


Abbildung 3:
Elektronenmikroskopische Darstellung von Kinozilien (K) im Trachealepithel von Hasen (Sanderson et al. 1981).
Bei Kinozilien handelt es sich um spezielle Ausstülpungen des apikalen Zellpols, die sich auf der Oberfläche vieler eukaryontischer Zellen finden. Kinozilien-tragende Zellen in der Trachea tragen auf ihrer Oberfläche zwischen 50-200 Kinozilien mit einer Länge von 5-6 μm und einem Durchmesser von 0,1-0,2 μm .

Im Respirationstrakt dienen Kinozilien dem Abtransport des Trachealsekrets und darin gelösten Fremdstoffen und sind somit von essentieller Bedeutung für die mukoziliäre Clearance. Als Grundgerüst besitzen die Kinozilien ein aus Mikrotubuli bestehendes Zytoskelett, das sog. Axonem (Satir et al. 2007). Ihre Beweglichkeit verdanken sie neben ihrem speziellen Aufbau v. a. dem zellulären Motorprotein Dynein (Satir et al. 2007, Lee et al. 2011). Der Aufbau der Kinozilien ist bei allen Säugetieren vergleichbar sowie, trotz zahlreicher kleinerer Unterschiede im mikroanatomischen Feinbau, eng verwandt mit dem von anderen Tierklassen (Satir et al. 1990, Wanner et al. 1996, Fisch et al. 2011, siehe Abbildung 4).

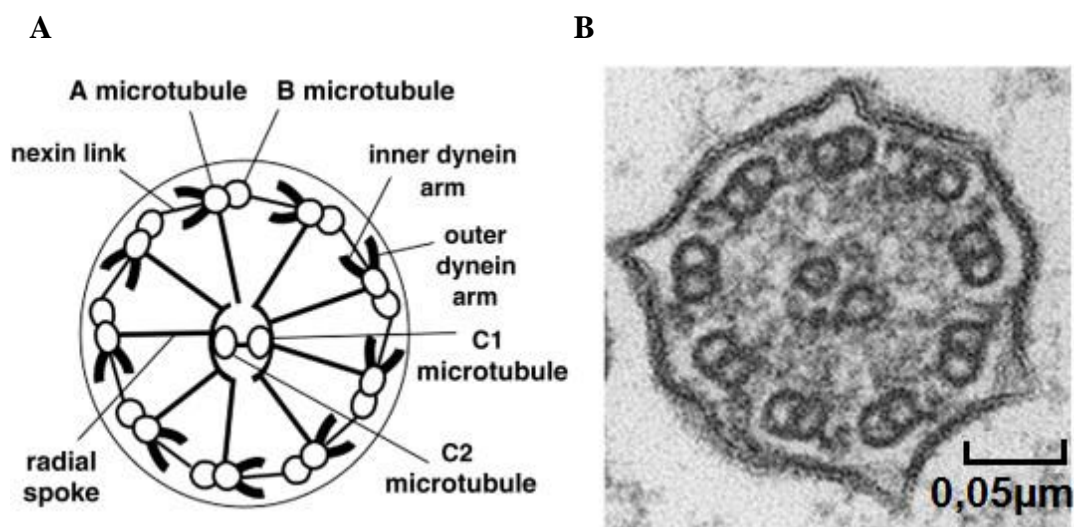


Abbildung 4: Schematischer (A) und elektronenmikroskopischer (B) Aufbau einer Kinozilie in den Atemwegen im Querschnitt mit klassischer „9+2-Struktur“ (Lee et al. 2011).

Die zentrale Mikrotubulusdoublette (C1- und C2-mikrotubule) wird von 9 radiär angeordneten Mikrotubulusdoubletten umgeben (A- und B-mikrotubule), die untereinander durch das Protein Nexin (nexin link) verbunden sind. Radiärspeichen (radial spoke) verbinden die peripheren Mikrotubulusdoubletten mit einem Proteinkranz, der das zentrale Mikrotubuluspaar umgibt. Dem A-Tubulus einer jeden peripheren Mikrotubulusdoublette sind innere (inner dynein arm) und äußere Dyneinarme (outer dynein arm) angelagert, die in Richtung des B-Tubulus der benachbarten Doublette projizieren.

Das Axonem der Kinozilien weist im Querschnitt eine charakteristische „9+2-Struktur“ auf. 9 Mikrotubulusdoubletten sind dabei radiär um ein zentrales Mikrotubuluspaar angeordnet. Die Grundbausteine der Mikrotubuli sind Alpha- und Beta-Tubulin Heterodimere, die durch längsgerichtete Verknüpfung Protofilamente bilden. Durch die seitliche Parallelverknüpfung dieser Protofilamente entsteht die Wand eines Mikrotubulus. Jede der Mikrotubulusdoubletten besteht dabei aus einem kompletten A-Tubulus, aufgebaut aus 13 Protofilamenten, an den ein inkompletter B-Tubulus, gebildet aus 10-11 Protofilamenten, angelagert ist (Satir et al. 2007). Für die Stabilität und den Zusammenhalt der Tubuli spielt Tektin eine wichtige Rolle, ohne das es zu einer

Dissoziation von A- und B-Tubulus kommt (Wanner et al. 1996). Die zentrale Mikrotubulusdoublette besteht aus einem singulären C1- und C2-Mikrotubulus und hat Bedeutung für die Schlagform. Fehlt sie, vollzieht die Kinozilie eine Dreh- anstelle einer Schlagbewegung (Chilvers et al. 2003, Lee et al. 2011).

Dyneinarme dienen der Bewegung und Stabilisierung des Axonems. Bei den Dyneinarmen handelt es sich dabei um Multi-Protein-Komplexe, die sich aus leichten, mittelschweren und schweren Ketten zusammensetzen. Ihre funktionelle Hauptkomponente ist das Motorprotein Dynein, eine ATPase. Es existieren 2 Arten von Dyneinarmen. Die äußeren und inneren Dyneinarme sind mit dem A-Tubulus einer jeden peripheren Mikrotubulusdoublette verbunden und projizieren in Richtung des B-Tubulus der benachbarten Doublette, mit dem sie nur unter Anwesenheit von ATP eine Verbindung eingehen. Durch die Hydrolyse von ATP wird eine unidirektionale Gleitbewegung zwischen benachbarten Mikrotubulusdoubletten ermöglicht, bei der der A-Tubulus in Richtung des Basalkörpers verschoben wird. (Satir et al. 1989 & 1990). Während die inneren Dyneinarme einen sehr komplexen Aufbau mit verschiedenen Subtypen besitzen, scheint die elektronenmikroskopische Struktur der äußeren Dyneinarme einheitlicher (Porter et al. 2000). Die äußeren Dyneinarme von Kinozilien im Trachealepithel von Säugetieren sind 2-köpfige bouquetartige Moleküle mit einem Molekulargewicht von 1-2 Millionen Dalton. Jeder ihrer Köpfe wird durch eine schwere Kette mit ATPase-Eigenschaften gebildet, die über mehrere leichte und mittelschwere Ketten im Mikrotubulus verankert ist. Die leichten Ketten sind dabei von Bedeutung bei der Regulation der Dyneinfunktion (Wanner et al. 1996). Man nimmt an, dass innere und äußere Dyneinarme verschiedene Funktionen übernehmen. Die äußeren Dyneinarme scheinen dabei v. a. die Geschwindigkeit der Gleitbewegung zwischen Mikrotubulusdoubletten zu kontrollieren und auf diese Weise die KSF zu regulieren. Die inneren Dyneinarme hingegen steuern das Ausmaß der Gleitbewegung und damit die Amplitude des Kinozilienschlags (Fisch et al. 2011).

Die Angaben über die durchschnittliche KSF variieren in Abhängigkeit von der Untersuchungsmethode, Tierart und Spezies sowie der Lokalisation des Kinozilientragenden Epithels innerhalb der Atemwege (Kennedy et al. 1981, Sleight et al. 1988). Im menschlichen Respirationstrakt schwanken die Angaben über die KSF bei Körpertemperatur und Messung in vitro zwischen 10-15 Hz (Wanner et al. 1996, Salathe 2007).

Verschiedene akzessorische Proteine bilden Brücken zwischen den Mikrotubulusdoubletten und verknüpfen diese so zum funktionierenden Axonem (Lee et al. 2011). Über das Protein Nexin sind benachbarte äußere Mikrotubulusdoubletten zirkulär miteinander verbunden (Eley et al. 2005). Die sog. Nexinbrücken sind paarig angelegt und liegen in der Nähe der Basis der inneren Dyneinarme, von wo aus sie zum benachbarten B-Tubulus projizieren. Sie sind relativ starr und wirken daher stabilisierend auf das Mikrotubulusskelett. Die ebenfalls aus Proteinen aufgebauten Radiärspeichen liegen meist in Dreiergruppen entlang des A-Tubulus und inserieren in einem Proteinkranz, der das zentral gelegene Mikrotubuluspaar umgibt. Die Funktion der Nexinbrücken und Radiärspeichen ist nur unvollständig verstanden. Vermutlich dienen sie aber dazu, das Ausmaß der dyneininduzierten Gleitbewegung zwischen den Mikrotubulusdoubletten zu limitieren und so die Gleit- in eine Beugebewegung des gesamten Axonems umzuwandeln (Satir et al. 1990, Houtmeyers et al. 1999). Gleichzeitig verleihen sie dem Axonem die für den Kinozilienschlag notwendige Stabilität und Elastizität (Salathe 2007, Braiman et al. 2008).

Im Längsschnitt ist das Axonem über den Großteil seiner Länge gleichmäßig aus repetitiv angeordneten Einheiten aufgebaut, die sich alle 96 nm wiederholen. Die Grundstruktur einer Einheit enthält pro Mikrotubulusdoublette jeweils 4 äußere Dyneinarme, 3-4 innere Dyneinarme, 3 Radiärspeichen sowie eine paarige Nexinbrücke (Satir et al. 1990). Nur am basalen und apikalen Ende der Kinozilie weicht der Aufbau von diesem einheitlichen Muster ab. Die B-Tubuli verlieren sich zum apikalen Ende der Kinozilie hin und lediglich die A-Tubuli inserieren zusammen mit dem zentralen Mikrotubuluspaar in einen transmembranösen Komplex, die sog. „ziliäre Krone“, die 3-7, 25-35 nm kurze klauenartige Ausläufer trägt. Diese transmembranären Filamente penetrieren während des effektiven Kinozilienschlags (siehe Kapitel 1.2.3) den aufliegenden Mukus mechanisch bzw. chemisch und transportieren diesen so in Richtung Kehlkopf (Wanner et al. 1996). Die singulären Enden der peripheren A-Tubuli sind an der Kinozilienspitze über Filamente straff mit der ziliären Membran verbunden. Die Filamente erhöhen die Biegesteifheit und ermöglichen somit einen effizienteren Mukustransport (Kubo et al. 2008). Am proximalen Ende der Kinozilien befindet sich der Basalkörper, der die Kinozilie im Zellkörper verankert. Die Mikrotubuli sind hier als Triplets organisiert. Dem kompletten A- und inkompletten B-Tubulus der Mikrotubulusdoubletten ist ein weiterer inkompletter C-Tubulus angelagert (Eley et al. 2005). Der Basalkörper besitzt einen ins Zytoplasma reichenden lateralen Fuß, von dem aus sog. Wurzelfasern zur

Verankerung des Axonems bis tief in das Zytoplasma projizieren. Die Ausrichtung dieses lateralen Fußes entspricht dabei der Richtung des Kinozilienschlags und zeigt bei allen Kinozilien einer Zelle in dieselbe Richtung (Chilvers et al. 2000). Von den Basalkörperchen polymerisieren die Mikrotubuli in Richtung des apikalen Zellpols (Satir et al. 2007). Die Kinozilienlänge ist dabei genetisch festgelegt und hat Einfluss auf ihre Funktionsfähigkeit, insbesondere auf die KSF.

Das Axonem ist von einem hoch spezialisierten Ausläufer der Zellmembran umgeben, in der sich spezifische Rezeptoren und Ionenkanäle befinden, die über Signalkaskaden Wachstum und Funktion der Kinozilien steuern. Dazu gehören Rezeptoren für zyklische Nukleotide, Calciumkanäle und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (Satir et al. 2007). Über die gesamte Länge der Kinozilie bestehen Verbindungen zwischen den äußeren Mikrotubulusdoubletten und der ziliären Membran (Dentler et al. 1980). An der Übergangszone zwischen ziliärer und zellulärer Membran befindet sich, in Höhe des distalen Endes des Basalkörpers, ein weiterer Transmembrankomplex. Diese sog. Transitionszone oder auch „ciliary necklace“ genannt, ist allseitig über radiär verlaufende Fasern mit dem B-Tubulus der äußeren Mikrotubulusdoublette verbunden. Sie dient vermutlich als Barriere und ermöglicht den gefilterten Transport von Proteinen und Lipiden ins Innere der Zilie (Eley et al. 2005, siehe Abbildung 5).

Veränderungen des mikroanatomischen Feinbaus der Kinozilien, wie beispielsweise das Fehlen der inneren oder äußeren Dyneinarme, sowie strukturelle Veränderungen der Mikrotubuli haben einen gravierenden Einfluss auf die Funktionsweise der Kinozilien und können zu Mukostase und in der Folge z. B. zu rezidivierenden respiratorischen Infekten führen (Trinidad et al. 2007).

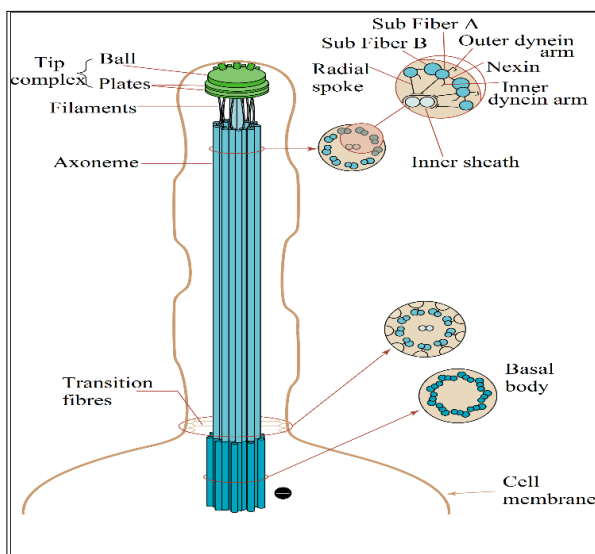


Abbildung 5: Axonem (axoneme) einer Kinozilie im Längsschnitt (Eley et al. 2005)

Die Kinozilie ist von einem spezialisierten Ausläufer der Zellmembran (cell membrane) umgeben. An der Übergangszone zwischen ziliärer und zellulärer Membran (cell membrane) befindet sich die sog. Transitionszone. Sie ist über Fasern (transition fibres) mit den äußeren Mikrotubulusdoubletten verbunden. Die Mikrotubuli polymerisieren vom Basalkörperchen (basal body) in Richtung der ziliären Krone (tip complex). In den Querschnitten zeigt sich die charakteristische „9+2-Struktur“ (Sub Fiber A und B) mit Nexinbrücken (nexin) und Radiärspeichen (radial spoke) sowie inneren (inner dynein arm) und äußeren Dyneinarmen (outer dynein arm).

1.2.3 Ablauf des Kinozilienschlags

Sanderson et al. (1981) gelang mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie und Hochgeschwindigkeitsaufnahmen die dreidimensionale Darstellung des Kinozilienschlags, wodurch sie seinen Ablauf in mehrere Einzelschritte unterteilen konnten. Der Zyklus beginnt mit einer Rückholbewegung der Kinozilien aus ihrer Ruheposition, an die sich unmittelbar ein aktiver Vorwärtsschlag anschließt (Sanderson et al. 1981, Sanderson et al. 1985). In der zeitlich flexiblen Ruhephase sind die Kinozilien in einer Ebene senkrecht zum Oberflächenepithel nach vorne, d. h. in Richtung des Mukoziliartransportes geneigt (Houtmeyers et al. 1999). Der Rückholschlag verläuft aus dieser Ruheposition heraus als dreidimensionale Bewegung und findet vollständig in der niederviskösen Solphase statt. Er beansprucht in Abhängigkeit von der KSF ungefähr 75% der gesamten Zykluszeit. Die Kinozilie beugt sich dabei ihrer Länge nach zur Seite und schwingt mit ihrer Spitze nahe des Oberflächenepithels im Uhrzeigersinn (von oben aus betrachtet) um 180° rückwärts, um sich dann für den sich unmittelbar anschließenden Vorwärtsschlag wieder aufzurichten. Der Vorwärtsschlag verläuft dann in einer Ebene senkrecht zum Oberflächenepithel, wobei die Kinozilienspitzen zum Oropharynx hin orientiert sind. Die Kinozilie ist dabei maximal gestreckt und beschreibt einen Bogen von circa 110° . Der Vorwärtsschlag ist mit Geschwindigkeiten von bis zu $10 \mu\text{m/s}$ dabei circa 2-3 mal schneller als die Rückholbewegung und beansprucht nur 25% der gesamten Zykluszeit (Aiello et al. 1972, Sanderson et al. 1985, Wanner et al. 1996, siehe Abbildung 6).

Neuere Untersuchungen stellen diesen von Sanderson et al. (1981) initial beschriebenen Bewegungsablauf zumindest für Kinozilien im Respirationstrakt in Frage. Ebenfalls mit Hilfe von digitalen Hochgeschwindigkeitsaufnahmen untersuchten Chilvers et al. (2000) Schlagform und Schlagfrequenzen von Mukus-depletierten Kinozilien in den oberen Atemwegen bei Menschen. Da sie eine nur minimale Abweichung zur Seite von maximal 5° während des Rückholschlages maßen, kamen sie zu dem Schluss, dass Vorwärts- und Rückwärtsschlag dort in der gleichen Ebene stattfinden.

Vorwärts- und Rückwärtsschlag der Kinozilien erfolgen während eines Schlagzyklus in entgegengesetzte Richtungen. Da die Dyneinarme aber lediglich eine unidirektionale Gleitbewegung zwischen benachbarten Mikrotubulusdoubletten ermöglichen, können nicht alle Dyneinarme einer Kinozilie gleichzeitig aktiv sein. Als Erklärungsversuch für die unterschiedliche Schlagrichtung während des Vorwärts- und Rückholschlages

entwickelten Satir und Matsuoka (1989) die sog. „Switch-Point-Hypothese“, der zu Folge die Dyneinarme jeweils nur einer Kinozilienhälfte wechselseitig aktiv sind. Während des Vorwärtsschlages sind demzufolge ausschließlich die Dyneinarme auf einer Seite des Axonems aktiv (beispielsweise die Dyneinarme der Mikrotubulusdoublette 1-4), wohingegen die Dyneinarme der anderen Hälfte nur bei der Rückholbewegung aktiv sind (Dyneinarme der Mikrotubulusdoublette 6-9). Durch diese wechselseitige Aktivierung entsteht elektronenmikroskopisch der Eindruck einer flimmernden Bewegung (Lee et al. 2011). Der genaue Mechanismus, der die wechselseitige Aktivierung der Dyneinarme ermöglicht, ist dabei letztendlich ungeklärt. Auch ist in diesem Erklärungsmodell die Funktion der 9. Mikrotubulusdoublette unklar (Sanderson et al. 1985, Satir et al. 1989). Im einfachsten Fall könnten rein mechanische Ursachen für die wechselseitige Aktivierung der Dyneinarme verantwortlich sein. So könnten die zunehmende Beugung der Kinozilie während ihres Schlages und die dabei entstehenden strukturellen Veränderungen zwischen den Dyneinarmen und den Mikrotubulusdoubletten für die Aktivierung der Dyneinarme der Gegenseite verantwortlich sein. Ebenfalls von Bedeutung in diesem Zusammenhang scheint die Existenz mehrerer Subtypen der inneren Dyneinarme zu sein, die für die Schlagform verantwortlich sind (Salathe 2007, siehe Kapitel 1.2.2).

Für einen effizienten Mukoziliartransport ist der mehrschichtige Aufbau des Trachealsekrets essentiell. In der Solphase finden sowohl der Rückhol- als auch der Vorwärtsschlag statt. Durch den ständigen Wechsel zwischen Vorwärts- und Rückholschlag findet epithelnah kein effektiver Flüssigkeitstransport statt. Während des Vorwärtsschlages penetrieren die Kinozilienspitzen jedoch die oberen Schichten der Sol- und v. a. auch der Gelphase und transportieren diese so in Richtung Kehlkopf (Sleigh et al. 1988, Wanner et al. 1996). Die niedervisköse Solphase ermöglicht durch ihren im Vergleich zur Gelphase geringen Strömungswiderstand dabei den schnellen Vorwärtsschlag der Kinozilien. Die Aufrechterhaltung einer Schichthöhe zwischen 5-10 µm ist daher von großer Wichtigkeit für die Effizienz des Mukoziliartransportes. Eine zu große Schichtdicke verhindert einen effektiven Mukustransport, da während des aktiven Vorwärtsschlages die Kinozilienspitzen nicht mehr in den Mukus penetrieren und ihn auf diese Weise in Richtung Oropharynx transportieren können. Auf Grund der hohen Bindekraft des Mukus führt eine zu geringe Schichthöhe andererseits dazu, dass die Kinozilien in der viskösen Mukusschicht kleben bleiben, wodurch der

Mukoziliartransportes ebenfalls reduziert wird (King et al. 1989, Chilvers et al. 2000, Knowles et al. 2002).

Die Bedeutung der Mukusschicht als Transportmedium für deponierte Partikel zeigt sich beispielsweise an Experimenten von Sleigh et al. (1988). Ein Ersatz durch Ringerlösung führte trotz unveränderter KSF in ihren Versuchen zu einer deutlichen Reduktion des Partikeltransportes. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch Spungin et al. (1984), die nach Zugabe von Mukus auf ein depletiertes Atemwegsepithel die Wiederherstellung der ursprünglichen KSF und Partikeltransports beobachteten.

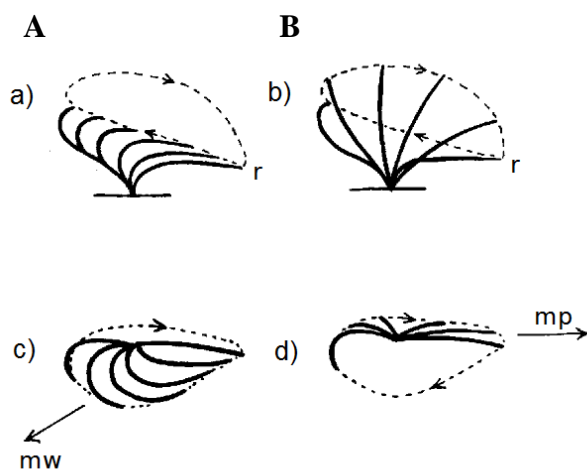


Abbildung 6: Der Schlagzyklus einer Kinozilie von der Seite (A, B) und von oben (C, D) dargestellt (Sleight et al. 1988).

Der Rückholschlag (abgebildet auf der linken Seite) beginnt aus der Ruhephase (r) heraus. Die Kinozilie schwingt im Uhrzeigersinn nach links (von oben aus gesehen), um sich für den sich anschließenden Vorwärtsschlag (abgebildet auf der rechten Seite) aufzurichten. Der Vorwärtsschlag verläuft in einer Ebene senkrecht zum Oberflächenepithel, wobei die Kinozilienspitzen zum Oropharynx hin orientiert sind. Die Kinozilie ist dabei maximal gestreckt und beschreibt einen Bogen von 110° . Der Mukus wird dabei Richtung Oropharynx transportiert (mp). Die Fortleitung der metachromalen Welle geschieht während des Rückholschlages und ist der Transportrichtung des Mukus entgegengesetzt (mw).

1.2.4 Koordination des Kinozilienschlags

Für einen gerichteten und effizienten Mukus- und Partikeltransport, auch über größere Distanzen hinweg, ist eine zeitliche und örtliche Koordination des Zilienschlags der einzelnen Kinozilien unabdingbar (Wanner et al. 1996). Während alle Kinozilien einer Zelle zeitgleich schlagen, sind die Schlagzyklen von Kinozilien, die sich in der Ausbreitungsrichtung des effektiven Kinozilienschlags befinden, nicht vollständig synchron, sondern zeitlich leicht versetzt, sodass es zur Bildung eines metachromalen Bewegungsmusters kommt (Eshel et al. 1987, Wanner et al. 1996). Durch den zeitlich versetzten Kinozilienschlag befindet sich der transportierte Mukus außerdem ständig in Bewegung, wodurch der durch die Kinozilien zu überwindende Widerstand deutlich geringer ist, sodass die Transportgeschwindigkeit des Mukus nahezu der KSF entspricht (Satir et al. 1990).

Die Ablagerung eines Fremdkörpers in den Atemwegen hat eine stimulierende Wirkung auf das Trachealepithel und bewirkt die lokale Exozytose von intrazellulär gespeichertem Mukus. Der Mukus umhüllt den deponierten Fremdpartikel und wirkt darüber hinaus aktivierend auf die Kinozilien, die daraufhin ihre Ruhephase beenden. Nach ihrer Aktivierung führen die Kinozilien zunächst einen Rückholschlag aus, gefolgt von dem effektiven Vorwärtsschlag, durch den die Fremdpartikel in Richtung Oropharynx abtransportiert werden (Sleigh et al. 1981, Spungin et al. 1984). Während des seitlichen Rückholschlages kommt es zur Aktivierung benachbarter Kinozilien. Diese werden dadurch angeregt, ihre Ruhephase zu beenden und ebenfalls einen neuen Schlagzyklus zu beginnen (Sanderson et al. 1981, Sleigh et al. 1988). Da die Aktivierung benachbarter Kinozilien während des seitlichen Rückholschlages stattfindet, stimmt die Ausbreitungsrichtung der metachromalen Welle nicht mit der Transportrichtung überein, und Kinozilien, die sich entlang einer Linie rechtwinklig zur Flussrichtung der metachromalen Welle befinden, schlagen synchron (Wanner et al. 1996, siehe Abbildungen 6 und 7).

Für die Rekrutierung benachbarter Kinozilien während des ziliären Rückholschlages scheinen neben der direkten mechanischen Stimulation v. a. hydrodynamische Kräfte innerhalb der Periziliarflüssigkeit verantwortlich zu sein (Gheber et al. 1998). Durch Unregelmäßigkeiten in der Epitheloberfläche, z. B. durch Areale, in denen Kinozilientragende Zellen fehlen, ist die Ausbreitung einer metachromalen Welle auf ungefähr 5–9 µm begrenzt, man spricht von einem sog. metachromalem Feld. Die Tatsache, dass Kinozilien, die in vitro mehr als 10 µm voneinander entfernt sind, dennoch zu einem synchronisierten Kinozilienschlag in der Lage sind, schließt jedoch eine rein mechanische bzw. hydrodynamische Rekrutierung benachbarter Kinozilien als Erklärung für das Zustandekommen des metachromalen Bewegungsmusters aus, sodass neuere Untersuchungen neben einer direkt mechanischen und indirekt hydrodynamischen Aktivierung benachbarter Kinozilien v. a. einen interzellulären Informationsaustausch maßgeblich für das Entstehen dieses metachromalen Bewegungsmusters verantwortlich machen (Wanner et al. 1996). Der genaue Mechanismus, der in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt, ist jedoch noch nicht bis ins letzte Detail geklärt. Allerdings wird vermutet, dass dabei Calcium-(Ca²⁺-) Wellen über „gap junctions“ hinweg an diesem interzellulären Informationsaustausch beteiligt sind (Wanner et al. 1996, Tindade et al. 2007, siehe Kapitel 1.3.5).

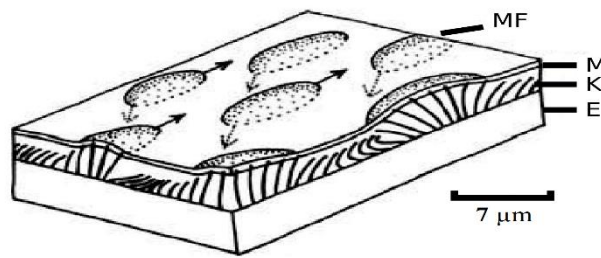


Abbildung 7: Schematisch dargestellt ist der Transport von Mukus (M) über metachromale Feldern (MF) des Flimmerepithels (E, Sleight et al. 1988).

Der Transport erfolgt in Richtung der durchgezogenen Pfeile. Während des ziliären Rückholschlages kommt es zur Aktivierung benachbarter ruhender Kinozilien (K) und so zu Bildung eines metachromalen Bewegungsmusters. Die gepunkteten Pfeile zeigen die Ausbreitungsrichtung der metachromalen Welle.

1.2.5 Einflussfaktoren auf die mukoziliäre Clearance

Verschiedene physiologische Faktoren beeinflussen die Aktivität der Kinozilien und damit die Geschwindigkeit der mukoziliären Clearance. Dazu gehören u. a. Alter, Geschlecht, Bewusstseinszustand und körperliche Ertüchtigung. Ferner unterliegt die ziliäre Aktivität einer circadianen Rhythmik (Rusznak et al. 1994). Daneben führen aber auch Umweltschadstoffe, wie u. a. Schwefeldioxid, Schwefelsäure und Stickstoffdioxid, zu Veränderungen an den Kinozilien sowie der Zusammensetzung des Trachealsekrets und haben auf diese Weise Einfluss auf die mukoziliäre Clearance (Chilvers et al. 2000).

Yager et al. (1976) untersuchten die Altersabhängigkeit der KSF an menschlichen Atemwegsepithelien in vitro. Sie konnten feststellen, dass die Schlagfrequenz der Kinozilien mit steigendem Alter abnimmt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Goodman et al. (1978), die die durchschnittliche KSF in verschiedenen Altersgruppen verglichen. Über den Einfluss des Geschlechts auf den Mukoziliartransport herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Hasani et al. (1994) untersuchten die Clearance-Rate eines inhalierten Radioaerosols und konnten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen in vergleichbarem Alter finden. Dem widersprechen Versuchsergebnisse von Svartengren et al. (1986), die schnellere Clearance-Raten bei Männern feststellen konnten. Körperliche Ertüchtigung scheint einen positiven Einfluss auf den Mukoziliartansport zu haben (Wolff et al. 1977), während die mukoziliäre Clearance im Schlaf reduziert scheint (Pavia 1984).

In vitro konnte außerdem ein Einfluss zahlreicher Pharmaka auf die mukoziliäre Clearance nachgewiesen werden (Wanner et al. 1996, Kummer et al. 2006, König et al. 2009). Ferner ist die mukoziliäre Clearance von der Luftfeuchtigkeit sowie der Viskosität

des Trachealsekrets abhängig (Chilvers et al. 2000, Dirksen et al. 1990, Gheber et al. 1998).

Auch Veränderungen des pH-Werts haben Auswirkungen auf die Geschwindigkeit der mukoziliären Clearance (Clary-Meinesz et al. 1998, Kienast et al. 1994, Sutto et al. 2004). Während Veränderungen des extrazellulären pH zwischen 7,5 und 10 ohne statistisch signifikanten Effekt auf die KSF bleiben, haben bereits kleine Veränderungen des intrazellulären pH (pH_i) weitreichende Folgen für die ziliäre Funktion. Für eine intrazelluläre Alkalisierung wurde dabei eine Beschleunigung der KSF beobachtet, während eine Abnahme des pH_i zu einer Reduktion der KSF führt (Kienast et al. 1994). Auch Veränderungen der Umgebungstemperatur besitzen einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Mukoziliartransportes (Jorisson et al. 1995, O'Callaghan et al. 1995, Mwimbi et al. 2003, Kilgour et al. 2004, Smith et al. 2011 siehe Kapitel 1.3.6).

Ferner existiert eine Kommunikation zwischen Kinozilien-tragenden Zellen in den Atemwegen und dem Immunsystem. Bei Entzündungsprozessen beispielsweise spielt $\text{TNF-}\alpha$ als proinflammatorisches Zytokin eine zentrale Rolle. In einer früheren Studie dieser Arbeitsgruppe konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass $\text{TNF-}\alpha$ über Bindung an TNF-R1 Rezeptoren eine Steigerung der KSF und PTG bewirkt. Die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen sind nicht bis ins letzte Detail geklärt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass Serotonin eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt (Weiterer et al. 2014).

1.3 Steuerung der ziliären Funktion

Kinozilien-tragende Epithelien sind in der Lage, die Kraft des Kinozilienschlags sowie dessen Frequenz in Abhängigkeit von mechanischen, elektrischen oder chemischen Stimuli zu variieren und so an veränderte Umweltbedingungen anzupassen.

Nach heutigem Stand der Forschung wird dabei die ziliäre Schlagfrequenz als wichtigste Determinante der mukoziliären Reinigung angesehen (Kienast et al. 1993).

Die Kraft des Kinozilienschlags ist abhängig von der Anzahl der Dynein-Mikrotubulus-Interaktionen. Während eines Kinozilienschlags sind dabei maximal 1000 der insgesamt 4000 inneren und äußeren Dyneinarme aktiv. Diese funktionelle Reserve ermöglicht einen relativ konstanten Mukoziliartransport, der weitestgehend unabhängig von der Viskosität des Trachealsekretes ist (Johnson et al. 1991, Andrade et al 2005).

1.3.1 Zustandsformen ziliärer Aktivität

Die Fähigkeit die Geschwindigkeit des Kinozilienschlags, sich an sich verändernde Umweltbedingungen anzupassen, ist eines der wesentlichen Kennzeichen des Mukoziliartransportes. Seybold et al. (1990) untersuchten die Auswirkung einer Änderung der KSF auf die mukoziliäre Clearance und konnten zeigen, dass eine Steigerung der KSF um 16% mit einer Zunahme der mukoziliären Clearance um 56% einhergeht.

Durch ein hohes Maß an Koordination und hohe Schlagfrequenzen können Kinozilien-tragende Epithelien deponierte Partikel mit bemerkenswerter Geschwindigkeit transportieren. King et al. (1974) beispielsweise maßen Transportgeschwindigkeiten von bis zu 0,5 mm/s mit der Stahlkugelchen durch den Kinozilienschlag transportiert werden konnten. Für derartige Transportleistungen ist ein hohes Maß an Energie in Form von ATP nötig. Um Energieressourcen zu schonen, schlagen Kinozilien in den Atemwegen unter „normalen“ Bedingungen daher nicht mit der maximal möglichen Frequenz (Zagoory et al. 2002). Neben einem Grundzustand mit geringerer KSF existiert daher ein Zustand gesteigerter ziliärer Aktivität.

Ob die ziliäre Grundaktivität einer Kontrolle durch das autonome Nervensystem unterliegt, ist nicht abschließend geklärt (Ma et al. 2002, Wanner et al. 1996). Während Atropin einen dämpfenden Einfluss auf die KSF besitzt, hat die Antagonisierung weiterer Rezeptoren des autonomen Nervensystems auf der Oberfläche Kinozilien-tragender Zellen keinen Einfluss auf die ziliäre Grundaktivität (Corssen et al. 1959, Whiteside et al. 1984, Groth et al. 1991). Auch bleibt eine Vagotomie ohne Folgen für die basale KSF (Wanner et al. 1996). Die zellulären Mechanismen, die für die Aufrechterhaltung der ziliären Grundaktivität sorgen, sind insgesamt nur unzureichend erforscht. So ist beispielsweise nicht abschließend geklärt, ob ihre Aufrechterhaltung über die gleichen Signalkaskaden gesteuert wird, die auch für die Regulation des Zustandes gesteigerter ziliärer Aktivität verantwortlich sind oder ob es sich dabei um unterschiedliche Kontrollmechanismen handelt. In der diesbezüglich veröffentlichten Literatur finden sich jedoch zunehmend Hinweise, dass die ziliäre Grundaktivität lediglich von spontaner Dynein-Aktivität getragen wird, die lediglich an das Vorhandensein von ATP als intrazellulärem Energielieferanten gebunden ist.

Um die Geschwindigkeit der mukoziliären Clearance an sich verändernde Bedingungen anzupassen zu können, die z. B. einen erhöhten Sekrettransport aus den Atemwegen

notwendig machen, besitzen Kinozilien-tragende Zelle eine große Bandbreite verschiedener, v. a. G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Dazu gehören u. a. adrenerge, muskarinerge, purinerge und peptiderge Rezeptoren. Werden diese über die Bindung von extrazellulären Botenstoffen stimuliert, werden intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, die die Dynein-ATPase-Aktivität erhöhen und so zu einer Steigerung der KSF führen (Verdugo 1980, Ovadyahu et al. 1988, Sanderson et al. 1989, Villalon et al. 1989, Mason et al. 1991, Weiss et al. 1992, Wong et al. 1998, Gheber et al. 1989, Salathe et al. 1997, 1999 & 2007, Zagoory et al. 2001, Ma et al. 2002). Für nahezu alle Agonisten an Rezeptoren des autonomen Nervensystems konnte ein Einfluss auf die mukoziliäre Clearance nachgewiesen werden. Extrazelluläres ATP ist dabei unter physiologischen Bedingungen einer der potentesten parakrinen Stimulatoren der ziliären Aktivität, dessen Einfluss auf die KSF schon seit langem bekannt ist (Wanner et al. 1996, Uzlaner et al. 1999, Braiman et al. 2000a, Hayashi et al. 2005). Die stimulierende Wirkung von ATP auf die ziliäre Aktivität variiert dabei in Abhängigkeit der untersuchten Spezies, der Lokalisation des Kinozilien-tragenden Epithels innerhalb der Atemwege und der Konzentration an appliziertem ATP (Lieb et al. 2002, Zhang et al. 2003a, Hayashi et al. 2005, Schmid et al. 2011). Die Freisetzung von ATP, das seine Wirkung v. a. über Bindung an P2Y₂- und P2X-Rezeptoren vermittelt, wird u. a. getriggert durch die mechanische Beanspruchung des Atemwegsepithel (Homolya et al. 2000, Morse et al. 2001). Neben ATP konnte auch ein dosisabhängiger stimulierender Effekt cholinerg und beta-adrenerger Pharmaka auf die ziliäre Aktivität nachgewiesen werden, deren Bedeutung bei der Regulation der KSF in vivo jedoch kontrovers diskutiert wird (Wong et al. 1988, Salathe 2007). Je nach Untersuchungsmethode wurden für alpha-adrenerge Pharmaka sowie für Substanz P widersprüchliche Wirkungen auf die KSF beobachtet (Schlosser et al. 1995, Wanner et al. 1996). Für Neuropeptid Y wird in der Literatur mehrheitlich ein dämpfender Einfluss auf die KSF beschrieben (Cervine et al. 1991).

Auf zellulärer Ebene vermitteln verschiedene Botenstoffe (second messenger) die Effekte der extrazellulären Rezeptorliganden (Wanner et al. 1996, Salathe et al. 1999, Ma et al. 2002). Zu den wichtigsten Modulatoren der ziliären Funktion gehören zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und intrazelluläre Calciumionen (Ca²⁺-Ionen). Diese second messenger steuern die ziliäre Funktion nicht über voneinander unabhängige Signalkaskaden, sondern sind Bestandteil eines komplexen Regulationsmechanismus, bei dem sich die verschiedenen second messenger sowohl in ihrer Produktion als auch in ihrer gemeinsamen Wirkung auf die

ziliäre Aktivität gegenseitig verstärken, z. T. jedoch aber auch voneinander unabhängig die KSF steuern können (siehe Abbildung 8 und Kapitel 1.3.5).

Die molekularen Feinheiten, die der Steuerung der ziliären Aktivität zugrunde liegen, werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Dies liegt u. a. nicht zuletzt an den unterschiedlichen Methoden zur Erforschung der Regulationsmechanismen der ziliären Funktion sowie der Verwendung unterschiedlicher Modellorganismen, die in der Folge zu z. T. konträren Ergebnissen führten. Trotz der weitestgehenden Übereinstimmungen im strukturellen Aufbau der verschiedenen ziliären Systeme (siehe Kapitel 1.2.2), finden sich zahlreiche Unterschiede bezüglich Schlagform und Regulation der ziliären Funktion (Lieb et al. 2002, Salathe 2007). Die beteiligten zellulären Mechanismen scheinen sich komplizierend bei Ein- und Mehrzellern sowie bei den unterschiedlichen Spezies der Säugetiere verschiedenartig organisiert zu sein, weshalb sich die v. a. an einzelligen Modellorganismen gewonnenen Erkenntnisse nur eingeschränkt auf die komplexeren Verhältnisse bei Säugetieren übertragen lassen. (Salathe 2007, Lieb et al. 2002). Darüber hinaus finden sich außerdem Hinweise, dass die KSF selbst in verschiedenen Abschnitten der Atemwege einer Spezies unterschiedlichen Kontrollmechanismen unterliegt (Hayashi et al. 2005, siehe Kapitel 1.2). Umstritten ist in der Literatur dabei v. a. die Involviertheit der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP bei der Regulation der KSF bei Säugetieren sowie die molekularen Mechanismen, die der Regulation der KSF durch intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen zugrunde liegen.

1.3.2 Einfluss von cAMP auf die ziliäre Aktivität

Der Einfluss von cAMP auf die KSF wird deutlich an Forschungsergebnissen von Hamasaki et al. (1991). Sie konnten zeigen, dass *Paramecium tetraurelia*, ein Organismus, der oftmals herangezogen wird, um die Effekte von second messengern auf die KSF zu untersuchen, sich in Anwesenheit von cAMP und ATP circa 50% schneller fortbewegt als in Kontrollgruppen, bei denen cAMP fehlte. Da die Zellmembran von *Paramecium* in ihren Versuchen durch Zugabe von Triton X-100 permeabilisiert wurde, ist davon auszugehen, dass cAMP seine Wirkung durch Bindung an Enzyme entfaltet, die direkt mit dem ziliären Axonem verbunden sind. Hochstrasser et al. (1996) gelang in diesem Zusammenhang der Nachweis der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) im ziliären Axonem von *Paramecium*. Die PKA ist dabei mittels sog. AKAPs (A-kinase-anchoring-proteins) direkt mit dem ziliären Axonem verbunden (Kultgen et al. 2002). Die durch

cAMP aktivierte PKA steuert über die gezielte Phosphorylierung spezieller Zielstrukturen des Axonems die Dynein-ATPase-Aktivität und damit die KSF. Als eine dieser axonalen Zielstruktur konnte p29 identifiziert werden. Dabei handelt es sich um eine Dynein-Leichtkette der äußeren Dyneinarme, die ebenfalls erstmalig in Paramecium isoliert wurde (Hamasaki et al. 1991, Salathe 2007).

Die Regulation der Kinozilenschlagfunktion durch cAMP ist komplex und setzt die PKA-vermittelte Phosphorylierung vermutlich mehrerer unterschiedlicher axonaler Zielstrukturen voraus, die stimulierenden oder auch dämpfenden Einfluss auf die KSF haben können. Dies legen zumindest Forschungsergebnisse von Howard et al. (1994) nahe, die zeigen konnten, dass bei Chlamydomonas die cAMP-abhängige Phosphorylierung eines weiteren Regulationskomplexes, der sich zwischen den Radiärspeichen und den inneren Dyneinarmen befindet (Gardner et al. 1994), im Gegensatz zur Phosphorylierung von p29 bei Paramecium, eine Reduktion der KSF bewirkt.

Die Quelle für cAMP in vivo sind mindestens 9 verschiedenartig regulierte Isoformen von v. a. G-Protein gekoppelten membranständigen Adenylyl Zyklasten (mAC), von denen einige in der apikalen Zellmembran Kinozilien-tragender Zellen exprimiert werden. Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten konnten zeigen, dass beta2-adrenerge Pharmaka sowie VIP in vitro die KSF in einer cAMP-abhängigen Weise stimulieren. Auch Adenosin, das durch Hydrolyse aus an der Oberfläche von Kinozilien-tragenden Zellen freigesetztem ATP entsteht, stimuliert den G-Protein gekoppelten Adenosin-A2b-Rezeptor, der wiederum über eine Aktivierung von mACs die Kinozilenschlagfunktion über die cAMP-PKA-Signalkaskade beeinflusst (Wanner et al. 1996, Morse et al. 2001, Lee et al. 2014). Die Bedeutung von Adenosin bei der Regulation der ziliären Aktivität in vivo wird jedoch kontrovers diskutiert (Salathe 2007, siehe Kapitel 4.3). Im Axonem Kinozilien-tragender Zellen finden sich außerdem lösliche Adenyl Zyklasten (sAC), die die KSF in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$), des pH_i oder der intrazellulären Bikarbonatkonzentration regulieren (Salathe 2007, Schmid et al. 2007 & 2011).

In der Literatur finden sich zunehmend Hinweise, dass auch bei der Regulation der KSF bei Säugetieren cAMP-abhängige Proteinkinasen durch gezielte Phosphorylierungsvorgänge axonaler Zielstrukturen eine Rolle spielen könnten; so wurden beispielsweise axonale Zielstrukturen für PKA-vermittelte Phosphorylierungsvorgänge auch bei Säugetieren gefunden (Salathe et al. 1993a & b,

2007). Die Beteiligung der cAMP-PKA-Signalkaskade an der Regulation der ziliären Aktivität bei Säugetieren ist in der Literatur jedoch keineswegs unumstritten. Versuche an verschiedenen Säugetierspezies führten in der Vergangenheit zu unterschiedlichen Ergebnissen. Uzlaner et al. (1999) beobachteten beispielsweise in ihren Versuchen am Trachealepithel von Hasen nach Inhibierung der PKA keine Veränderung eines ATP-induzierten ziliären Frequenzanstiegs. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Lieb et al. (2002) in ihren Experimenten am Trachealepithel von Schafen. Nach Inhibierung der PKA im menschlichen Atemwegsepithel hingegen stellten sie eine signifikante Abnahme der KSF fest (Lieb et al. 2002).

Insgesamt ist die Rolle der PKA bei der Regulation der KSF bei Säugetieren daher ungeklärt. Die Diskrepanzen in den Forschungsergebnissen zur Bedeutung der cAMP-PKA-Signalkaskade bei der Regulation der KSF scheinen jedoch z. T. durch speziesspezifische Unterschiede in der Regulation der KSF erklärbar (Salathe et al. 1999).

1.3.3 Einfluss von cGMP auf die ziliäre Aktivität

Neben cAMP finden sich Hinweise, dass auch cGMP und die Proteinkinase G (PKG) an der Regulation der KSF in den Atemwegen beteiligt sind. Dies zeigt sich u. a. an Versuchen von Braiman et al. (2000a), die in ihren Experimenten nach Blockade der cGMP-PKG-Signalkaskade ein Ausbleiben eines Agonisten-induzierten Anstiegs der KSF beobachteten.

cGMP wird von verschiedenen Guanylatcyclasen (GC) gebildet. Dabei unterscheidet man membrangebundene Formen, die durch extrazelluläre Liganden, wie z. B. das atriale natriuretische Peptid, zur Bildung von cGMP stimuliert werden, von löslichen GC (sGC). Die Aktivierung von sGC erfolgt beispielsweise durch Stickstoffmonoxid (NO), das u. a. von der Calcium-Calmodulin(Ca-CaM)-abhängigen Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) synthetisiert wird (Schmidt et al. 1994, McDonald et al. 1995).

Trotz zahlreicher Forschungsergebnisse, die von einem positiven Zusammenhang zwischen der KSF und cGMP berichten, ist die Beteiligung von cGMP bei der Kontrolle der KSF v. a. bei Säugetieren letztendlich nicht geklärt. Während bei Menschen und Rindern die Applikation von cGMP die KSF stimulierte (Wyatt et al. 1998, Geary et al. 1995), blieb bei Hasen und Schafen eine Einflussnahme aus. Tamaoki et al. (1991) berichten sogar von einer Abnahme der KSF im Zusammenhang mit cGMP.

Auch die zellulären Mechanismen, die der cGMP-abhängigen Regulation der ziliären Aktivität zugrunde liegen könnten, sind dabei insgesamt weniger erforscht als cAMP-vermittelte Kontrollmechanismen. Sowohl PKA- als auch PKG-vermittelte Phosphorylierungen axonaler Zielstrukturen könnten dabei eine Rolle spielen. Ob die cGMP-abhängige Regulation der KSF zusätzlich an intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen bzw. CaM gebunden ist, wird in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert (Salathe 2007, siehe Kapitel 1.3.5).

1.3.4 Einfluss von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen auf die ziliäre Aktivität

Intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen sind weit verbreitete second messenger, die eine Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Funktionen, wie z. B. die Kontraktion in Muskelzellen, Sekretionsvorgänge oder auch die Genexpression, vermitteln (Braun et al. 1995). Bezogen auf die mukoziliäre Clearance vermitteln intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben.

Da eine effektive mukoziliäre Clearance in Abwesenheit des Trachealsekrets nur eingeschränkt stattfinden kann, vermutet man eine Kommunikation zwischen Kinozilien-tragenden und Mukus-produzierenden Zellen. Neben mechanischen Faktoren scheinen dabei Ca^{2+} -Wellen über „gap junctions“ hinweg für den interzellulären Informationsaustausch verantwortlich zu sein (Wanner et al. 1996). Auch vermutet man, dass intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen für die Synchronisation des Kinozilienschlags zwischen Kinozilien der selben bzw. benachbarten Zellen verantwortlich sind (siehe Kapitel 1.2.4). Eine bedeutende Rolle scheinen intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen v. a. aber bei der Regulation des Zustandes gesteigerter ziliärer Aktivität zu spielen. Ein positiver Zusammenhang zwischen intrazellulären Ca^{2+} -Ionen und der KSF wurde erstmalig durch Naitho et al. (1972) beschrieben. Zu den extrazellulären Stimuli, die einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bewirken, gehören ATP (Korngreen et al. 1996 & 1998, Villalon et al. 1989, Evans et al. 1999), Agonisten an muskarinergen Rezeptoren, wie z. B. ACh (Salathe et al. 1995 & 1997), Bradykinin (Paradiso et al. 1991) sowie die mechanische Stimulation des Kinozilien-tragenden Epithels (Sanderson et al. 1990).

Im Kinozilien-tragenden Epithel der Atemwege funktioniert die Signaltransduktion über intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen, wie in den meisten elektrisch nicht erregbaren Zellen, über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Die Bindung von ATP oder ACh an extrazelluläre purinerge bzw. muskarinerge Rezeptoren aktiviert in einem ersten Schritt

die PLC- β (Katan 1998). Dabei handelt es sich um ein in der Plasmamembran befindliches Enzym, das hauptsächlich über ein G-Rezeptorprotein gesteuert wird. Das aktivierte Enzym hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG, Irvine 2003). IP₃ wiederum stimuliert über IP₃-Rezeptoren die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern und sorgt so für einen initialen schnellen Anstieg der [Ca²⁺]_i (Berridge et al. 1993, Bootman et al. 2009). DAG aktiviert in einem zweiten Schritt die Proteinkinase C (PKC), die den Einstrom von Ca²⁺-Ionen aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol bewirkt (Nishizuka 1988). Darüber hinaus führt die Bindung von ATP an P2X-Rezeptoren auf der Oberfläche Kinozilien-tragender Zellen über die direkte Öffnung von Ionenkanälen zu einem zusätzlichen Einstrom von Ca²⁺-Ionen ins Zellinnere (Braiman et al. 2000a).

Da für eine anhaltende Steigerung der KSF längerfristige Erhöhungen der [Ca²⁺]_i nötig sind, diese jedoch potentiell schädlich oder sogar letal für Zellen sein können (Rasmussen et al. 1990, Orrenius et al. 2003, Dong et al. 2003), wird der Anstieg der [Ca²⁺]_i mit Hilfe der Ca²⁺/2H⁺-ATPasen der intrazellulären Calciumspeicher auf die apikalen Zellmembran-nahen Kompartimente beschränkt. Nach dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik breiten sich Moleküle entsprechend ihres Konzentrationsgradienten gleichmäßig im gesamten zur Verfügung stehenden Verteilungsvolumen aus. Mathematischen Berechnungen zufolge würden sich daher die intrazellulären Ca²⁺-Ionen innerhalb von nur 1-2 Sekunden gleichmäßig im Zytosol der Zelle verteilen (Braiman et al. 2008). Bei der Aufrechterhaltung einer lokal erhöhten [Ca²⁺]_i in der Nähe der apikalen Zellmembran spielen die intrazellulären Calciumspeicher der Mitochondrien und des sarkoplasmatischen Retikulums die entscheidende Rolle (Rasmussen et al. 1990). Die aus dem Extrazellulärraum einströmenden Ca²⁺-Ionen verteilen sich, dem Konzentrationsgradienten folgend, bis tief in das Zellinnere. Dort werden sie von Ca²⁺/2H⁺-ATPasen aktiv in die intrazellulären Calciumspeicher aufgenommen. Aufgrund ihrer begrenzten Aufnahmekapazität müssen diese intrazellulären Calciumspeicher, um ihre Übersättigung zu verhindern, Ca²⁺-Ionen zurück ins Zytosol einschleusen. Dies geschieht in der Nähe der apikalen Zellmembran, sodass die Ca²⁺-Ionen innerhalb der intrazellulären Calciumspeicher passiv, entsprechend ihres Konzentrationsgradienten, vom Ort ihrer Aufnahme im Zellinneren in Kinozilien-nahe Zellkompartimente transportiert werden (Rasmussen et al. 1990, Braiman et al. 2000b & 2008).

Die zellulären Mechanismen, die der Regulation der ziliären Aktivität durch intrazelluläre Ca²⁺-Ionen v. a. bei Säugetieren zugrunde liegen, werden in der Literatur nach wie vor

kontrovers diskutiert. Während bei Einzellern wie *Paramecium tetraurelia* und *Tetrahymena* beispielsweise eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ mit einer Reduktion der KSF bis hin zur Umkehr der Schlagrichtung einhergeht, wird bei Säugetieren eine steigende $[Ca^{2+}]_i$ regelhaft mit einer Zunahme der KSF assoziiert, wohingegen eine sinkende $[Ca^{2+}]_i$ mit einer Abnahme der KSF einhergeht (Naito et al. 1972, Girad et al. 1986, Sanderson et al. 1989, Villalon et al. 1989, Di Benedetto et al. 1991, Korngreen et al. 1994 & 1996, Salathe et al. 1995 & 1999, Lansley et al. 1999, Uzlaner et al. 1999, Braiman et al. 2001, Zagoory et al. 2002).

Vergleichbar mit den zyklischen Nukleotiden cAMP und cGMP, die ihren Einfluss auf die KSF hauptsächlich über die Aktivierung von Proteinkinasen und die nachfolgende gezielte Phosphorylierung axonaler Zielstrukturen ausüben, scheinen auch intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen die KSF durch die Bindung an Ca^{2+} -abhängige Enzyme, wie z. B. Kinasen oder Phosphatasen, zu steuern (Wanner et al. 1996). Zusätzlich wird vermutet, dass intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen als Kofaktoren anderer regulatorisch wirkender Proteine die Kinozilienfunktion steuern. Zellen besitzen eine Vielzahl Ca^{2+} -bindender Proteine. In den meisten Zellen spielt Calmodulin (CaM) dabei eine große Rolle. Bei CaM handelt es sich um ein hitzebeständiges Protein (≈ 17 kDa), das 4 Ca^{2+} mit hoher Affinität ($\approx 1 \mu M$) binden kann (Manalan et al. 1984, Gnegy 1993). Schon frühe Forschungsergebnisse von Verdugo (1980), die mit CaM-Inhibitoren arbeiteten, ließen vermuten, dass intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen ihre Wirkung über die Bindung an CaM und die Bildung von Ca-CaM entfalten. Auf welche Weise Ca-CaM wiederum die KSF auf molekularer Ebene regulieren, ist weiterhin nicht abschließend geklärt. Diskutiert wird die Existenz Ca-CaM-abhängiger Kinasen bzw. Phosphatasen, die ebenfalls durch die gezielte Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung axonaler Zielstrukturen die KSF beeinflussen könnten. In diesem Zusammenhang gelang bei *Tetrahymena* der Nachweis einer Ca-CaM-abhängiger Kinasen und entsprechender axonaler Zielproteine (Hirano-Ohnishi et al. 1989, Chilcote et al. 1990). Smith et al. (2008) zeigten durch Versuche an *Chlamydomonas*, dass sich eine Ca^{2+} -vermittelte Steigerungen der KSF durch Inhibierung von Ca-CaM und der Ca-CaM-abhängigen Kinase II unterbinden lässt. Die Bedeutung von Ca^{2+} - und Ca-CaM-abhängigen Enzymen für die Regulation der KSF bei Säugetieren hingegen ist unklar. Aufgrund des biochemisch komplexen Aufbaus des ziliären Axonems bei Säugetieren gestaltet sich die Identifizierung von möglichen axonalen Zielstrukturen für CaM-Kinase-vermittelte Phosphorylierungsvorgänge schwierig (Blouin et al. 2000). Bis dato konnten bei Säugetieren daher keine axonalen

Zielstrukturen für Ca-CaM-vermittelte Phosphorylierungsvorgänge nachgewiesen werden (Salathe 2007).

Erste Untersuchungsergebnisse mit Ca-CaM-Inhibitoren, nach deren Applikation eine Stimulierbarkeit der KSF durch unterschiedliche Aktivatoren ausblieb, ließen vermuten, dass auch bei Säugetieren Ca-CaM-abhängige Kinasen in die Regulation der KSF involviert sind (Salathe 2007). Die verwendeten Ca-CaM-Inhibitoren stellten sich jedoch später als toxisch für Kinozilien heraus. Bei Verwendung weniger toxischer Ca-CaM-Inhibitoren, wie W-7 und Calmidazolium, fand sich in der Folge zunächst kein Einfluss auf die KSF (Salathe et al. 1999). Zagoory et al. (2002) hingegen konnten in der Folge jedoch zeigen, dass auch die Applikation von W-7 und Calmidazolium einen Anstieg der KSF unterbindet. Allerdings führten sie ihre Versuche nicht am Kinozilien-tragenden Epithel der Trachea von Säugetieren, sondern am Oesophagusepithel von Fröschen durch, wodurch ihre Forschungsergebnisse nur eingeschränkt auf andere Kinozilien-tragende Systeme übertragbar sind. Forschungsergebnisse von Braiman et al. (2000b) wiederum, die ihre Experimente am trachealen Flimmerepithel von Hasen durchführten, konnten nachweisen, dass nach extrazellulärer Stimulation Kinozilien-tragender Zellen mittels ATP und zusätzlicher Applikation von Ca-CaM-Inhibitoren trotz hoher $[Ca^{2+}]_i$ ein Anstieg der KSF ausbleibt. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die physiologische Relevanz von Ca-CaM bei der Regulation der ziliären Funktion bei Säugetieren nach wie vor nicht abschließend geklärt ist.

Darüber hinaus finden sich Hinweise, dass Ca-CaM bzw. intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen durch Bindung an Zielstrukturen im ziliären Axonem selbst Konformationsänderungen herbeiführen können und auf diese Weise die KSF direkt, unabhängig von weiteren Signalkaskaden, beeinflussen. Dymeck et al. (2007) identifizierten mit Hilfe der Immunpräzipitation und Massenspektrometrie einen CaM-haltigen Proteinkomplex im Axonem von *Chlamydomonas reinhardtii*, der bei der Regulation der Dynein-Aktivität beteiligt zu sein scheint. Sakato et al. (2007) identifizierten die sog. LC4-Dynein-Leichtkette am äußeren Dyneinarm von *Chlamydomonas*, bei der es sich um ein CaM-ähnliches Protein handelt. Durch die Bindung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen vollzieht die LC4-Dynein-Leichtkette eine Konformationsänderung, die in der Folge die mechano-chemischen Interaktionen zwischen den Mikrotubuli und dem Motorprotein Dynein modifiziert und so die KSF direkt beeinflusst. Auch Im Axonem und in der ziliären Membran von *Paramecium* sowie bei *Tetrahymena* konnten mehrere Bindungsstellen für

CaM nachgewiesen werden, die über ähnliche Mechanismen die KSF beeinflussen könnten (Wanner et al 1996).

Forschungsergebnisse zur Lokalisation von Ca^{2+} - bzw. CaM-sensiblen Proteinen im Axonem der Kinozilien von Säugetieren beschränken sich auf Experimente von Gordon et al. (1982), die in entsprechenden Versuchen mittels Immunelektronenmikroskopie am respiratorischen Epithel von Hamstern, die Bindung von CaM in einer Ca^{2+} -abhängigen Weise an die Mikrotubuli, die Dyneinarme des ziliären Schafts, die Basalkörper und die Plasmamembran feststellen konnten. Welche Auswirkung die Bindung von CaM an diese Bindungsstellen auf die KSF jedoch tatsächlich hat, wurde bis dato nicht abschließend geklärt (Wanner et al. 1996). Erste Hinweise auf eine direkte Einflussnahme intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen auf integrale Bestandteile des Axonems bei Säugetieren liefern Versuche von Kakuta et al. (1985) am respiratorischen Epithel von Kaninchen. Nach Permeabilisierung der ziliären Membran mittels Saponin konnten sie eine Abhängigkeit der ziliären Aktivität von der Menge applizierter Ca^{2+} -Ionen nachweisen. Auch neuere Forschungsansätze, die die gleichzeitige Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der KSF bei intakter Zellmembran ermöglichen, legen die Vermutung nahe, dass intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen ihre Wirkung nicht ausschließlich über komplexe Signalkaskaden, sondern z. T. durch direkte Bindung an axonale Strukturen (möglicherweise Leichtketten der äußeren Dyneinarme, siehe Kapitel 1.2.2) steuern, da einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unmittelbar ($< 100 \text{ ms}$) ein Anstieg der KSF folgt (Salathe et al. 1995 & 1999, Lansley et al. 1999, Zhang et al. 2003a). Durch die gleichzeitige Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der KSF lässt sich jedoch ein kausaler Zusammenhang zwischen intrazellulären Ca^{2+} -Ionen und der KSF nicht zwangsläufig ableiten, sodass es sich bei den entsprechenden Beobachtungen lediglich um Epiphänomene handeln könnte (Salathe et al. 1999). Einer möglicherweise direkten Einflussnahme intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen auf axonale Strukturen widersprechen z. B. Forschungsergebnisse von Lansley et al. (1992) an permeabilisierten Gewebekulturen aus der Trachea von Hasen. In ihren Experimenten konnten sie zeigen, dass eine Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ allein keine Auswirkung auf die KSF hat. In diesem Zusammenhang sind auch Forschungsergebnisse von Ma et al. (2002) interessant, die ebenfalls nachweisen konnten, dass isolierte Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ohne Auswirkung auf die KSF bleiben.

Intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen scheinen insgesamt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der ziliären Funktion einzunehmen. Die zellulären Mechanismen die dabei eine Rolle spielen sind nach wie vor jedoch nicht endgültig geklärt und in der Literatur umstritten. Je nach Untersuchungsmethode und untersuchter Tierart finden sich dabei Hinweise, dass

intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen ihre Wirkung durch Bindung an integrale Bestandteile des ziliären Axonems bzw. über die Beeinflussung Ca^{2+} -abhängiger Enzyme entfalten.

1.3.5 Regulationsmechanismen zur Steuerung der ziliären Aktivität

Während man ursprünglich annahm, dass intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen, cAMP und cGMP, u. a. in Abhängigkeit des extrazellulären Rezeptoragonisten die KSF voneinander unabhängig über unterschiedliche Signalkaskaden steuern (Sanderson et al. 1989, Sleight et al. 1990), sammeln sich zunehmend Hinweise, dass die verschiedenen Kontrollmechanismen der ziliären Funktion zusätzlich eng miteinander verknüpft sind. Die verschiedenen Signalkaskaden bilden dabei ein komplexes Regulationsnetzwerk, bei dem sich die einzelnen second messenger sowohl in ihrer gegenseitigen Produktion als auch in ihrer gemeinsamen Wirkung auf die KSF untereinander beeinflussen, jedoch aber z. T. auch in der Lage sind, die KSF voneinander unabhängig zu regulieren (Zagoory et al. 2002, Braiman et al. 2008, Schmid et al. 2011, siehe Abbildung 8).

In den Kinozilien-tragenden Zellen der Atemwege konnten in diesem Zusammenhang Ca^{2+} -abhängige sAC nachgewiesen werden, die zu einer Verstärkung der cAMP-PKA-Signalkaskade führen (Nlende et al. 2007, Schmid et al. 2011, siehe Kapitel 1.3.2). Nach Aktivierung der NOS können Ca-CaM die KSF über die cGMP-PKG-Signalkaskade stimulieren (Stuehr et al. 2004, siehe Kapitel 1.3.3). Während sich also Hinweise finden, dass intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen bzw. Ca-CaM die cAMP- und cGMP-abhängigen Signalkaskaden verstärken, scheinen auch die zyklischen Nukleotide selbst eine verstärkende Wirkung auf Ca^{2+} -gekoppelte Regulationsmechanismen zu haben. Dies zeigt sich an Experimente von Zagoory et al. (2002). Nach Stimulation der PKA beobachteten sie einen Anstieg sowohl der Konzentration an intrazellulären Ca^{2+} -Ionen als auch an cGMP. Auch Braiman et al. (1998) beobachteten die Freisetzung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen als Folge der Stimulation der cAMP-PKA-Signalkaskade mittels Forskolin, einem Stimulator von Adenylyl Zyklasen. In dem gleichen Sinne führte auch eine Aktivierung der PKG über einen positiven, bis jetzt noch nicht endgültig geklärten „Feedback-Mechanismus“, zu einem vermehrten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus den intrazellulären Calciumspeichern in das Zytosol (Uzlaner et al. 1999, Braiman et al. 1998 & 2008).

Die Verflechtung und gegenseitige Verstärkung der drei Signalwege zur Steuerung der ziliären Aktivität zeigt sich nicht nur auf der Produktionsebene der verschiedenen second

messenger, sondern auch anhand ihres gemeinsamen Einflusses auf die KSF. So ist in der Literatur umstritten, ob intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen unabhängig von anderen Signalkaskaden eine direkt stimulierende Wirkung auf die ziliäre Aktivität besitzen (siehe Kapitel 1.3.4). Die Steuerung des Zustandes gesteigerter ziliärer Aktivität durch intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen bzw. Ca-CaM scheint zumindest bei einigen Säugetierspezies an cAMP und cGMP gekoppelt zu sein. Die isolierte Applikation von Ca^{2+} -Ionen oder in Kombination mit CaM in Abwesenheit von cGMP oder cAMP zeigte sich mehrfach ohne Einfluss auf die KSF (Ma et al. 2002, Salathe 2007, siehe Kapitel 1.3.4). Braiman et al. (2000b) beobachteten weiterhin eine funktionelle Entkoppelung zwischen der KSF und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation von Ca-CaM-Inhibitoren. Trotz hoher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ blieb ein Anstieg der KSF aus. Auch die Blockade der NO-cGMP-PKG Signalkaskade führte zu vergleichbaren Ergebnissen (Uzlaner et al. 1999, Braiman et al. 2000a & b).

Neben der engen funktionellen Verknüpfung der verschiedenen Signalkaskaden zur Regulation der ziliären Aktivität scheinen die verschiedenen Kontrollmechanismen der ziliären Funktion komplizierend, zumindest teilweise, auch voneinander unabhängig die KSF steuern zu können (Zagoory et al. 2002, Schmid et al. 2011). So finden sich zunehmend Hinweise, dass die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP die KSF auch unabhängig von Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskaden regulieren können, wobei sich jedoch der Effekt von cAMP und cGMP auf die KSF in Anwesenheit von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen potenziert (Ma et al. 2002). In Experimenten von Braiman et al. (1998) am Oesophagusepithel von Fröschen beispielsweise führte die Applikation von Forskolin, bzw. dibutyryl-cAMP, einem membrangängiges cAMP-Analogon, auch in Ca^{2+} -freiem Milieu, zu einem unveränderten Anstieg der KSF. Ob die cGMP-anhängige Aktivierung der PKG an das Vorhandensein anderer zellulärer second messenger wie z. B. intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen gekoppelt ist, wird in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert. Zhang et al. (2003b) untersuchten den Zusammenhang zwischen cGMP und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei der Regulation der KSF im respiratorischen Epithel von Hasen mittels Hochgeschwindigkeitsmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie. Sie konnten zeigen, dass cGMP die ziliäre Aktivität in einer Ca^{2+} -unabhängigen Weise stimuliert. Intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen wurden in ihren Versuchen durch die Zugabe von BAPTA/AM gebunden. Der Effekt von cGMP auf die KSF ließ sich durch gleichzeitige Applikation von KT5823, einem spezifischen Inhibitor der PKG, nicht jedoch durch Applikation von BAPTA/AM unterbinden, sodass sie schlussfolgerten, dass die PKG Ca^{2+} -unabhängig durch gezielte Phosphorylierungsvorgänge axonaler Zielstrukturen, ähnlich des cAMP-

vermittelten Regulationsmechanismus, einen direkten Einfluss auf die KSF ausübt (Salathe 2007). Komplizierend konnten Zhang et al. (2003b) in ihren Experimenten jedoch zusätzlich nachweisen, dass neben dem Ca^{2+} -unabhängigen Einfluss von cGMP auf die KSF intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen zusätzlichen zu passageren Erhöhungen der cGMP-vermittelten KSF-Steigerungen führen, die sich durch Zugabe von BAPTA/AM, nicht jedoch durch Zugabe von KT5832, unterbinden ließen. Der Einfluss von cGMP scheint daher insgesamt komplex und beinhaltet sowohl Ca^{2+} -abhängige als auch Ca^{2+} -unabhängige Mechanismen.

Insgesamt sind die molekularen Mechanismen, die bei der Regulation der KSF eine Rolle spielen, sehr komplex. Intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen scheinen dabei speziessübergreifend eine zentrale Rolle einzunehmen, sind allein jedoch nicht in der Lage die ziliäre Funktion zu steuern, sondern sind Bestandteil eines komplexen Regulationsnetzwerkes, das an die Existenz zusätzlicher zellulärer Signalkaskaden gekoppelt ist. Dagegen scheinen cAMP und cGMP die ziliäre Aktivität zumindest teilweise Ca^{2+} -unabhängig steuern zu können. Welche der intrazellulären Signalkaskaden dabei primär stimuliert werden ist, zumindest in vitro, abhängig von dem extrazellulären Stimulus. Agonisten an beta-adrenergen Rezeptoren führen zu einer Stimulation von mACs und aktivieren nachfolgend direkt die cAMP-PKA-Signalkaskade (Verdugo 1980, Wanner et al. 1996, Salathe 2007). Die Stimulation muskarinerger bzw. purinerger Rezeptoren hingegen scheint die KSF vornehmlich über Ca^{2+} -abhängige Kontrollmechanismen zu regulieren. Dabei scheinen sich jedoch auch die intrazellulären Signalkaskaden nach Stimulation mit ATP bzw. ACh nicht vollständig zu entsprechen und bezüglich vieler Aspekte speziesspezifisch zu sein (Schmid et al. 2011, siehe Kapitel 1.3.2 und 1.3.3).

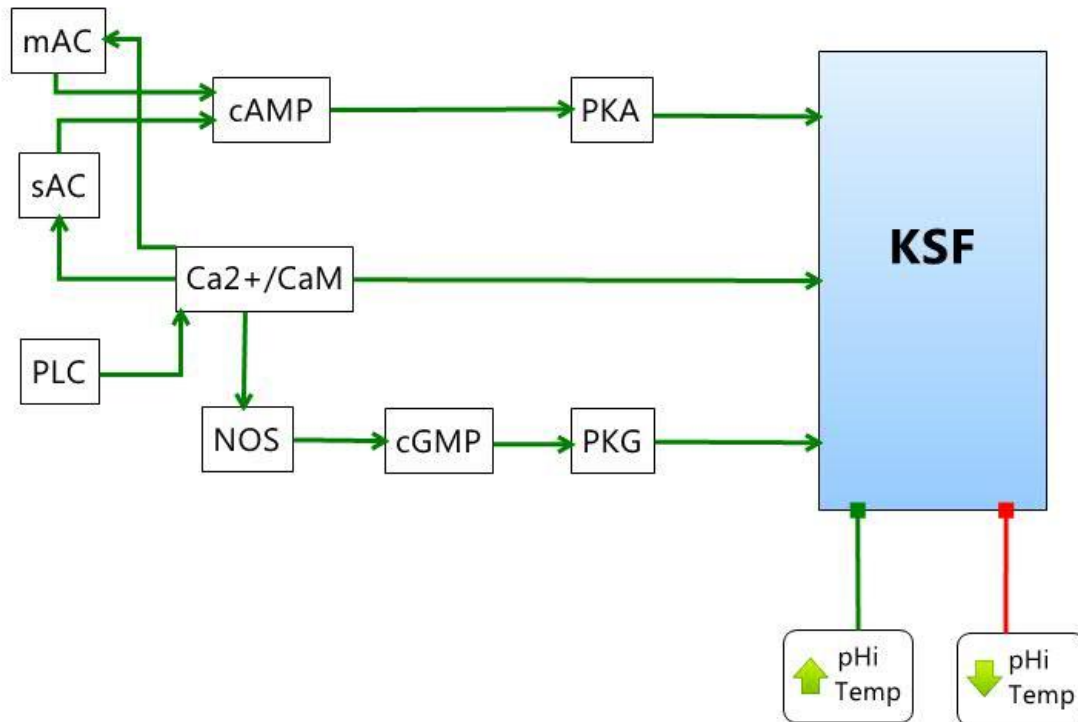


Abbildung 8: Steuerung der KSF über cAMP-, cGMP- und Ca^{2+} -abhängige intrazelluläre Signalkaskaden. Veranschaulicht werden die unterschiedlichen Signalkaskaden, die in die Regulation der ziliären Aktivität involviert sind. In grün dargestellt sind intrazelluläre Signalkaskaden, die einen stimulierenden Einfluss auf die ziliäre Funktion haben, in rot dargestellt sind Inhibitoren der KSF. An der Regulation der KSF sind vornehmlich die drei second messenger in cAMP, cGMP und intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen beteiligt, die die ziliäre Aktivität als komplexes Regulationsnetzwerk synergistisch steuern. Die intrazellulären Ca^{2+} -Ionen werden aus den intrazellulären Calciumspeichern freigesetzt oder entstammen dem Extrazellulärraum. intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen aktivieren die KSF direkt über Ca^{2+} - bzw. Ca-CaM- abhängige Kinasen oder über die Beeinflussung cAMP- bzw. cGMP-abhängiger Signalkaskaden. Die intrazelluläre Produktion von cAMP wird initiiert durch die Aktivierung membranständiger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (mAC) bzw. löslicher sAC. Ca-CaM stimulieren die KSF zusätzlich über die NOS-cGMP-PKG-Signalkaskade. Darüber hinaus haben auch der pH-Wert und die Umgebungstemperatur einen Einfluss auf die KSF, deren zugrunde liegenden Mechanismen bis dato unbekannt sind.

1.3.6 Einfluss von Temperatur auf die ziliäre Aktivität

Während der Einfluss extrazellulärer Rezeptoragonisten, wie z. B. ATP, auf die ziliäre Aktivität und die involvierten intrazellulären Signalkaskaden in der Vergangenheit ausführlich untersucht wurden, sind die zellulären Mechanismen, die der Regulation der KSF durch Veränderungen der Temperatur zugrunde liegen nur unzureichend erforscht. Temperaturveränderungen haben Einfluss auf nahezu alle biologischen Prozesse und Systeme (Eshel et al. 1986, Humphries et al. 2013). Der Einfluss von Temperatur auf die ziliäre Funktion ist im Zusammenhang mit Veränderungen der Körperkerntemperatur, z. B. bei Fieber im Rahmen von Entzündungsreaktionen oder bei Unterkühlung, von Bedeutung.

Dass Veränderungen der Umgebungstemperatur die mukoziliäre Clearance beeinflussen, ist seit langem bekannt. Bereits bei Calliburces et al. (1858) finden sich erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Temperatur und der KSF, wobei seine Beobachtungen jedoch noch keine quantitativen Analysen zuließen. Irvani et al. (1967) untersuchten in der Folge den schädigenden Einfluss hoher bzw. niedriger Temperaturen auf die KSF. Ihre Versuche führten sie an Lungenwegspräparaten von Ratten, Meerschweinchen und Katzen durch. Bei Temperaturen $< 2-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $> 42-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnten sie keine ziliäre Aktivität feststellen. Im dazwischenliegenden Temperaturbereich beobachteten sie dagegen eine Zunahme der KSF mit steigenden Temperaturen. Nachfolgende Studien, u. a. an Gewebekulturen von Hasen, Menschen und Rindern, bestätigten diese Ergebnisse (Mercke et al. 1974, Kennedey et al. 1981, Svartengren et al. 1986, Deitmer et al. 1989, Jorisson et al. 1995, Mwimbi et al. 2003, Smith et al. 2011).

Forschungsergebnisse zum Einfluss einer Temperaturveränderung auf die ziliäre Transportleistung im Hinblick auf die PTG finden sich in der Literatur bis dato nicht.

Zu Interpretationsschwierigkeiten der Forschungsergebnisse bezüglich des Einflusses von Temperatur auf die ziliäre Funktion führt die Tatsache, dass einige Forschergruppen die Temperaturabhängigkeit der ziliären Funktion ausgehend von der Raumtemperatur untersuchten, andere wiederum höhere Ausgangstemperaturen wählten, um so die physiologische Körpertemperatur zu imitieren (Mwimbi et al. 2003). Die publizierten Ergebnisse variieren in Abhängigkeit von der verwendeten Methode, Ausgangstemperatur und Spezies. Selbst Messungen an der gleichen Spezies mit derselben Messtechnik führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Schlussfolgerungen zum Einfluss von Temperatur auf die ziliäre Funktion nach wie vor umstritten sind (Eshel et al. 1986, Mwimbi et al. 2003). Auch sind die zellulären Mechanismen, die für die Vermittlung des Effekts von Temperatur auf die ziliäre Aktivität verantwortlich sind, nach wie vor unbekannt. Unklar ist, ob dabei die gleichen intrazellulären second messenger von Bedeutung sind, die auch für die Vermittlung des Effekts von z. B. ATP auf die ziliäre Aktivität verantwortlich sind.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Die Regulation der ziliären Aktivität ist komplex und involviert in Abhängigkeit des extrazellulären Stimulus verschiedene intrazelluläre Mechanismen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer passageren Temperaturänderung auf die ziliäre Transportfunktion sowie deren Vermittlung auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Im Mittelpunkt stand dabei die Bedeutung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen. Ferner wurde zusätzlich die Rolle intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bei der Aufrechterhaltung der ziliären Grundaktivität untersucht.

Die ziliäre Aktivität wurde dabei direkt durch Bestimmung der KSF quantifiziert. Ferner wurde die ziliäre Transportleistung durch Messung der Geschwindigkeit, mit der Partikel einer definierten Größe (Dynabeads) durch den Kinozilienschlag im Trachealepithel von Mäusen transportiert wurden, ermittelt.

Konkret wurden dabei folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Haben Temperaturveränderungen einen Einfluss auf die PTG und KSF?
- 2) Ist der temperaturbedingte Einfluss auf die ziliäre Transportleistung reversibel und wiederholbar?
- 3) Welche Rolle spielen intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen bei der Vermittlung temperaturbedingter Veränderungen der ziliären Transportleistung und der Aufrechterhaltung der ziliären Grundaktivität?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Organentnahme

Bei den untersuchten Tieren handelte es sich um männliche Mäuse der Zuchtlinie Black 6-N C57 mit einem Alter zwischen 13-15 Wochen. Bezogen wurden die Tiere über Charles Rivers Laboratories (Wilmington, Massachusetts, USA). Sie wurden in Käfigen bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Futter und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt. Die Durchführung aller Versuche erfolgte entsprechend des deutschen Tierschutzgesetzes gemäß Paragraph §§ 1, 4, 17.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Inhalation einer Überdosis Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) in einem verschließbaren Becherglas. Nach Feststellung des Todes wurden die Mäuse in Rückenlage fixiert und das Bauchfell mit einer 70%igen Alkohollösung (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland) befeuchtet. Die sich anschließende Präparation zur Freilegung und Säuberung des thorakalen Abschnittes der Trachea beanspruchte circa 24 Minuten. Begonnen wurde mit einer medianen Laparatomie und beidseitigen Schnitten entlang des kaudalen Rippenbogens. Das Darmkonvolut wurde nach lateral verdrängt und die so dargestellte Aorta abdominalis durchtrennt, um das Tier auszubluten. Der mediane Hautschnitt wurde nach kranial bis zum Kehlkopfbereich fortgeführt und das Fell, vom Hautschnitt ausgehend, nach lateral von Körperfazien und Muskulatur abgelöst. Die infrahyale Muskulatur sowie die Speicheldrüsen der ventralen Halsseite wurden vorsichtig entfernt. Im Anschluss erfolgte die Thorakotomie durch beidseitige Schnitte entlang der mittleren Axillarlinie nach kranial. Die beiden Längsschnitte wurden durch einen horizontalen Schnitt in Höhe des kranialen Endes des Corpus sterni, unter Durchtrennung der Mm. scaleni verbunden. Das Diaphragma wurde nun vom Rippenbogen abgelöst, sodass der knöcherne Thorax vorsichtig abgehoben werden konnte. Um freie Sicht auf die Trachea zu erhalten, wurde das Manubrium sterni längs durchtrennt und zusammen mit den Ansätzen der ersten beiden Rippenbögen entfernt. Die Claviculae wurden beidseits durchtrennt. Anschließend wurde die Trachea vorsichtig frei präpariert, wobei peritracheale Muskelstränge und Bindegewebe sowie der dorsal der Trachea gelegene Ösophagus entfernt wurden. Dabei wurde besonders darauf geachtet, das Kinozilien-tragende Epithel der Trachea nicht durch Überstreckung oder durch zu starken Zug am Präparat zu beschädigen. Circa 12 Minuten nach Präparationsbeginn wurde die Trachea

knapp unterhalb des Krikoids sowie kurz oberhalb der Bifurkation durch schräge Schnitte abgesetzt und in ein Delta-T-Kulturschälchen (T-Dish, Biotechs Inc., New Jersey, USA) transferiert, die als Messkammer während der Versuche dienten. Die abgesetzte Trachea wurde mittels 2-3 Minuten mittig in der Sylgardbodenbeschichtung des T-Dishes (siehe Kapitel 2.2.1) unter physiologischer Streckung des Musculus trachealis derart fixiert, dass die trachealen Knorpelspangen zum Boden des T-Dish hin orientiert und die Paries membranaceus im T-Dish obenauf zu liegen kam (siehe Abbildung 9). Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde das Präparat unmittelbar mit raumtemperierter HEPES-Ringer-Pufferlösung (siehe Kapitel 2.2.2) gespült. Die Feinpräparation der circa 3-4 mm langen Pars thoracica erfolgte unter Sicht durch ein Stereo-Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) in 20ig-facher Vergrößerung. Circa 22 Minuten post mortem wurde die Trachea erneut mit raumtemperierter HEPES-Ringer-Pufferlösung gespült, um Haare und Präparationsreste zu entfernen. Der Musculus trachealis der Paries membranaceus wurde sodann der Länge nach durchtrennt. Nach abschließendem Spülen wurden anschließend 2 ml HEPES-Ringer-Pufferlösung mit einer Temperatur von 35 °C als Medium hinzupipettiert und das T-Dish dann in den Messstand transferiert (siehe Abbildung 9).

2.2 Versuchsvorbereitung

2.2.1 Bodenbeschichtung der Delta-T-Kulturschälchen

T-Dish dienten als Messkammer während der Versuche. Vor ihrer Verwendung wurden die T-Dish mit Sylgard 184 (Dow Corning GmbH, Wiesbaden), einem klaren Silikonelastomer, ausgegossen. Für die Verarbeitung von Sylgard 184 wurden 9 Teile der Base und 1 Teil des Härters für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gemischt und anschließend in einem Exsikkator von Luftblasen befreit. Die T-Dish wurden dann mit circa 1,5 ml Sylgardgel ausgegossen und anschließend für insgesamt 4 Stunden bei 65 °C im Wärmeschrank auspolymerisiert.

2.2.2 Herstellung der HEPES-Ringer-Pufferlösung

HEPES-Ringer-Pufferlösung diente als Spüllösung und als Medium während der Versuche. 1 l der Pufferlösung wurde hergestellt aus: 5,6 mM KCL, 136,4 mM NaCl, 10

mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 2,2 mM CaCl₂ (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) und 11 mM Glucose (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland). An einem pH-Meter wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) bei Raumtemperatur auf 7,4 eingestellt. In Versuchen, bei denen die Abhängigkeit von intrazellulären Ca²⁺-Ionen bei der Regulation der ziliären Funktion untersucht wurde, wurde eine Ca²⁺-freie HEPES-Ringer-Pufferlösung verwendet. Die Herstellung erfolgte analog, jedoch ohne Verwendung von CaCl₂. Möglicherweise verbliebene Spuren von Ca²⁺-Ionen im Puffer wurden durch Zugabe von Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in einer Konzentration von 1 mM gebunden. Die Zugabe von EGTA in den Puffer erfolgte 5 Minuten vor Beginn der ersten Messung in Minute 25. Die HEPES-Ringer-Pufferlösung wurde im Gefrierschrank bei -15 °C gelagert.

2.2.3 Herstellung von Stammlösungen

Zunächst erfolgte die Herstellung von Stammlösungen, die anschließend aliquotiert wurden. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei Raumtemperatur.

EGTA

EGTA wurde in Ampuwa (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) zu einer 0,1 molaren Stammlösung gelöst. In den Versuchen wurde EGTA in einer Konzentration von 1 mM verwendet.

ATP

ATP (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) wurde in HEPES-Ringer-Pufferlösung zu einer 0,01 molaren Stammlösung gelöst. Die Endkonzentration von ATP im Medium betrug nach Applikation 10 µM.

BAPTA/AM

25 mg BAPTA/AM (Calbiochem, Bad Soden) wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deisendorf) zu einer 0,001 molaren Stammlösung gelöst. Die Endkonzentration von BAPTA/AM im Medium betrug nach Applikation 10 µM.

2.3 Der Messstand

Die Messungen erfolgten mit einem Olympus Bx51WI Lichtmikroskop (Olympus GmbH, Hamburg, siehe Abbildung 9). Die T-Dish mit den darin im Sylgardgel fixierten Tracheen wurden dabei direkt unter das zu verwendende Wasserimmersionsobjektiv

(UMPlanFLN 20x/40x, Olympus GmbH, Hamburg) des Lichtmikroskops eingespannt. Eine Kamera (EHD Imaging GmbH, Damme), die oberhalb des Okulars befestigt war, zeichnete Sequenzen des optischen Systems bei Durchlicht (Lichtquelle TH4-200, Olympus GmbH, Hamburg) auf. Die Bilder wurden auf einen Computer (Dell, Round Rock, USA) übertragen und von der Software „Steampix“ (Norix Inc., Montreal, Kanada) aufgezeichnet. Zu jedem Messzeitpunkt wurden dabei Sequenzen mit einer Dauer von 16,73 Sekunden und einer Bildfrequenz von 11,78 Bildern aufgezeichnet.

An das Mikroskop angeschlossen war außerdem ein Thermostat (Biotechs Chromapho Analysen-Technik GmbH, Bottrop). Die Einstellung der Soll-Temperatur erfolgte in 0,1 °C-Schritten. Die Erwärmung der Messkammer erfolgte dabei über am Boden rechts und links des T-Dishes befindliche Heizelektroden, Temperaturabkühlungen erfolgten passiv. Während der Versuche konnte die Ist-Temperatur innerhalb des T-Dish mittels einer externen Temperaturelektrode (Dostmann Electronic, Hamburg) zusätzlich kontrolliert werden. Die Temperatur innerhalb des T-Dish konnte durch den Thermostaten mit einer Genauigkeit von $\pm 0,5$ °C konstant gehalten werden. Beobachtet wurde v. a. ein Temperaturanstieg mit zunehmender Entfernung vom Mittelpunkt des T-Dishes. Um während der Messungen eine gleichmäßig konstante Temperatur innerhalb des Schälchens einzustellen wurde deshalb 90 Sekunden vor Aufzeichnungsbeginn das Medium für 30 Sekunden durch mehrfaches Pipettieren durchmischt. Zusätzlich wurde bei allen Versuchen darauf geachtet, die Untersuchungsproben stets mittig im T-Dish zu platzieren.

Die Bodenbeschichtung der T-Dishes mit Sylgard führte außerdem zu einem Wärmeverlust, sodass ein Abweichen der Ist- von der am Thermostaten eingestellten Soll-Temperatur in Abhängigkeit von der Schichtdicke beobachtet wurde. Bei jedem verwendeten T-Dish wurde daher einmalig, unter Zuhilfenahme der externen Temperaturelektrode, die Temperatureinstellung am Thermostaten ermittelt, die innerhalb des T-Dish die gewünschte Temperatur mit einer Genauigkeit von $\pm 0,5$ °C konstant hielt.

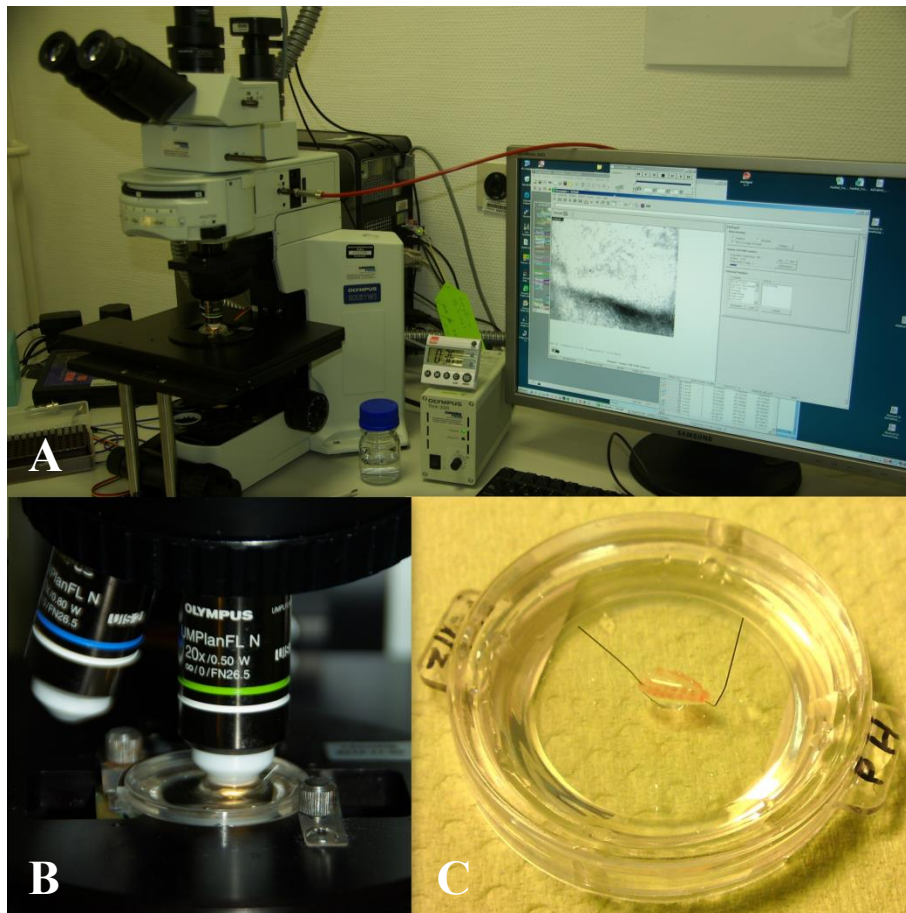


Abbildung 9:

A: Aufbau des Messstandes in Frontalansicht. Mikroskop und Versuchskammerhalterung mit integriertem Heizsystem. Oberhalb des Okulars befindet sich eine Kamera, die Sequenzen des optischen Systems bei Durchlicht aufzeichnet. Die Bilder werden auf einen Computer übertragen und mit Hilfe der Software „Steapix“ aufgezeichnet. Die Regulation der Versuchstemperatur erfolgt durch einen Thermostaten.

B: Vergrößerte Darstellung der Versuchskammerhalterung des Mikroskops. Die T-Dish mit den Versuchsproben werden direkt unter das Wasserimmersionsobjektiv des Lichtmikroskops eingespannt. Am Boden rechts und links des T-Dish befinden sich Heizelektroden. Die Messung der KSF erfolgt unter 40ig-facher und der PTG unter 20ig-facher Vergrößerung.

C: Trachea im Delta-T-Kulturschälchen. Im T-Dish mittels Minuten unter physiologischer Spannung fixierte Trachea nach Durchtrennung des Musculus trachealis.

2.4 Vorversuche

Die PTG als auch die KSF fielen unter Ruhebedingungen innerhalb der ersten 30 Messminuten stark ab und erreichten in Minute 60 einen Basiswert, der im folgenden Messintervall zwischen Minute 60 bis Minute 90 konstant blieb. Für die Versuche wurde Minute 60 daher als geeigneter Zeitpunkt gewählt, um passagere Veränderungen der Versuchstemperatur durchzuführen. Um physiologischere Verhältnisse zu imitieren, wurde eine Temperatur von 30 °C als Ausgangstemperatur für die Versuche gewählt.

Um geeignete Beobachtungszeiträume für die Temperaturveränderungen sowie sinnvolle Messintervalle festzulegen, wurde im Vorfeld der Versuche zunächst bestimmt, wie viel

Zeit benötigt wurde, um die Messkammer ausgehend von der Ausgangstemperatur von 30 °C auf die gewünschte Temperatur zu erwärmen bzw. abzukühlen. Die Raumtemperatur zum Messzeitpunkt betrug 20,6 °C.

Die Tabellen 1 und 2 geben einen Überblick über die im T-Dish zum Messzeitpunkt 3, 6, 9 und 12 Minuten nach Änderung der Soll-Temperatur am Thermostaten gemessenen Ist-Temperaturen innerhalb des Mediums.

Versuch	Zum Zeitpunkt T ₁	Zum Zeitpunkt T ₂	Zum Zeitpunkt T ₃ und T ₄
22° → 30 °C	29,1 °C	30 °C	30 °C
26 °C → 30 °C	29,4 °C	30 °C	30 °C
30° → 34 °C	32,8 °C	34 °C	34 °C
30° → 37 °C	35 °C	37 °C	37 °C
30° → 41 °C	35,7 °C	40,7 °C	41 °C

Tabelle 1: Ist-Temperatur im Medium bei Temperaturerhöhung:

Dargestellt ist die durchschnittliche Ist-Temperatur (n = 5) innerhalb des T-Dish zum Messzeitpunkt T₁ = 3 Minuten, T₂ = 6 Minuten, T₃ = 9 und T₄ = 12 Minuten nach Änderung der Soll-Temperatur am Thermostaten.

Versuch	Zum Zeitpunkt T ₁	Zum Zeitpunkt T ₂	Zum Zeitpunkt T ₃ und T ₄
41 °C → 30° C	31,8 °C	30 °C	30 °C
37 °C → 30° C	31,2 °C	30 °C	30 °C
34 °C → 30° C	30,8 °C	30 °C	30 °C
30° → 26° C	27,2 °C	26 °C	26 °C
30° → 22° C	27,1 °C	23,7 °C	22 °C

Tabelle 2: Ist-Temperatur im Medium bei Temperaturniedrigung:

Dargestellt ist die durchschnittliche Ist-Temperatur (n = 4) innerhalb der Messkammer zum Messzeitpunkt T₁ = 3 Minuten, T₂ = 6 Minuten und T₃ = 9 und T₄ = 12 Minuten nach Änderung der Soll-Temperatur am Thermostaten.

Bei den Versuchen, in denen die Bedeutung von intrazellulären Ca²⁺-Ionen bei der Regulation der ziliären Funktion untersucht wurde, erfolgte zusätzlich die Zugabe von BAPTA/AM (Calbiochem, Bad Soden). BAPTA/AM wurde in einer Konzentration von 10 µM in Minute 60 in das Medium appliziert. Bei BAPTA/AM handelt es sich um einen intrazellulären Chelator für freie Ca²⁺-Ionen. BAPTA/AM kann die Zellmembran frei passieren, dringt jedoch nicht in die intrazellulären Calciumspeicher ein. Als Lösungsmittel für BAPTA/AM diente Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deisendorf). In

Vorversuchen konnte ein möglicher Einfluss der isolierten Zugabe von DMSO auf die PTG ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 10).

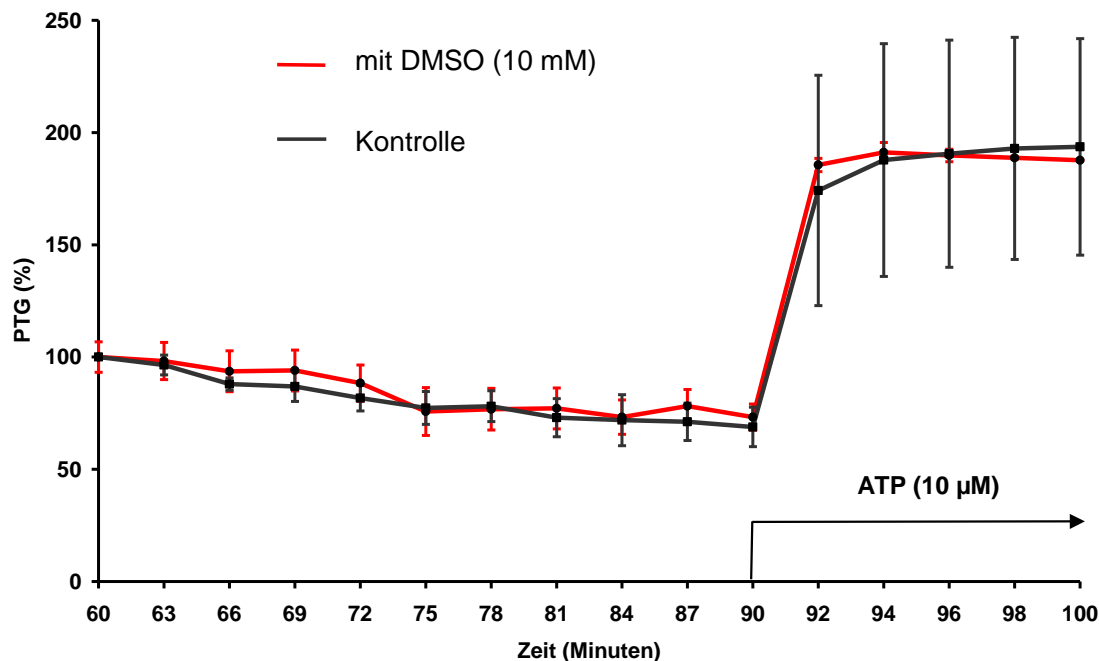


Abbildung 10: Vergleichende Darstellung der PTG bei konstanter Temperatur von 30 °C (Kontrollversuche n = 3) mit und ohne Zugabe von DMSO (10 mM, n = 3).

Dargestellt sind die PTG und zugehörige SD derjenigen Partikel, deren Wegstrecken nicht mehr als 15% von der am kürzesten möglichen abweichen, bezogen auf den Basiswert (100%) in Minute 60 als Referenz. Die Zugabe von ATP (10 µM) erfolgte direkt im Anschluss an die Messung in Minute 90. Die Versuche wurden nach 100 Minuten beendet

2.5 Allgemeines Versuchsprotokoll

Vor Beginn des Versuchs wurde ein mit 2 ml Aquadest. (Sigma GmbH, Deisendorf) befülltes T-Dish als Platzhalterschälchen unter das später für die Messung der PTG bzw. der KSF zu verwendende Objektiv eingespannt, wobei dieses leicht in die Flüssigkeit eingetaucht wurde. Der Thermostat wurde nun auf die Soll-Temperatur eingestellt, die im Medium eine Temperatur von 30 °C erzeugte, um so Objektiv und Temperaturelektroden für den Versuch vorzuwärmen. Im Anschluss erfolgte die Tiertötung und Organentnahme. Das T-Dish mit der Organprobe wurde circa 24 Minuten nach Versuchsbeginn an Stelle des Platzhalterschälchens unter das Wasserimmersionsobjektiv eingespannt und dort bis zum Messbeginn auf eine Temperatur von 30 °C erwärmt.

In Versuchen, in denen die Bedeutung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen bei der Regulation der ziliären Funktion untersucht wurde, erfolgte die zusätzliche Applikation von EGTA

in einer Konzentration von 1 mM, 5 Minuten vor Beginn der ersten Messung (Minute 25). EGTA wurde dazu an den Rand des T-Dish pipettiert und durch mehrfaches Mischen mit der Pipette gleichmäßig im Medium verteilt.

Der Messbeginn wurde auf Minute 30 nach Tod des Tieres festgelegt. In den darauf folgenden 30 Minuten wurden 7 Messungen in Abständen von 5 Minuten mit einer Dauer von jeweils 16,73 Sekunden durchgeführt.

Im Messintervall zwischen Minute 60 und 90 wurde die Versuchstemperatur verändert und die Auswirkungen auf die PTG bzw. KSF untersucht. Die Änderung der Soll-Temperatur erfolgte dabei immer im unmittelbaren Anschluss an die vorausgegangene Messung. Bei den Versuchen, in denen die Bedeutung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bei temperaturbedingten Veränderungen der PTG untersucht wurde, erfolgte zusätzlich zur Chelatkomplexbildung von extrazellulär vorhandenen Ca^{2+} -Ionen durch Zugabe von EGTA (1 mM) in Minute 25 die Applikation von BAPTA/AM, das in Minute 60 in einer Konzentration von 10 μM an den Rand des Versuchsschälchens pipettiert und anschließend durch mehrmaliges Mischen mit der Pipette homogen im Medium verteilt wurde. Die Messungen zwischen Minute 60 und 90 erfolgten bei den Versuchen zur PTG (siehe Kapitel 2.7) dabei in Abständen von 3 Minuten. Bei den Versuchen zur KSF (siehe Kapitel 2.6) erfolgten Messungen in Minute 60, 66, 72, 75 und 78 (siehe Kapitel 2.5).

Als Kontrollen (Kontrollgruppe), die bei der Versuchsauswertung für den statistischen Vergleich herangezogen wurden, dienten Versuche, in denen keine Temperaturveränderung bzw. Applikation von BAPTA/AM (10 μM , Minute 60) stattgefunden hatte.

Bei allen Versuchen erfolgte abschließend zur Vitalitätskontrolle ein Stimulationsversuch mit ATP in einer Konzentration von 10 μM . ATP wurde dazu unmittelbar nach der Aufzeichnung in Minute 90 an den Rand des Mediums pipettiert und anschließend durch mehrfaches Mischen mit der Pipette gleichmäßig innerhalb des T-Dishes verteilt. Bei den Versuchen zur PTG schlossen sich 5 Messungen über einen Zeitraum von 10 Minuten im Abstand von jeweils 2 Minuten an. Bei den Versuchen zur KSF erfolgte eine einmalige Messung nach Zugabe von ATP (10 μM) in Minute 94. Die Versuche wurden nach 100 Minuten beendet.

2.6 Versuche zur KSF

2.6.1 Messung der KSF

In diesen Versuchen wurde die KSF direkt gemessen. Die Messungen erfolgten mit einem Olympus Bx51WI Lichtmikroskop. Verwendet wurde ein Wasserimmersionsobjektiv mit 40ig-facher Vergrößerung, das zunächst auf einen Bildausschnitt fixiert wurde, in dem Kinozilien-tragende Zellen möglichst gleich verteilt und zahlreich aufzufinden waren. Der gefundene Ausschnitt wurde während der gesamten Versuchsdauer bei allen Messungen beibehalten. Jeweils 90 Sekunden vor Aufzeichnungsbeginn wurde das Medium für 30 Sekunden mit der Pipette durchmischt, um die Temperatur innerhalb des T-Dish zu vereinheitlichen und sodann eine einminütige Ruhepause vor Aufzeichnung eingehalten.

2.6.2 Versuche zur Temperaturabhängigkeit der KSF

In diesen Versuchen wurde die Soll-Temperatur einmalig für 12 Minuten im Messintervall zwischen Minute 60 und Minute 72 auf 22 °C (V-22 °C, n = 4) bzw. 41 °C (V-41 °C, n = 4) verändert und die Auswirkung auf die KSF beobachtet (siehe Abbildung 11A). Durch Wiederherstellung der ursprünglichen Versuchstemperatur von 30 °C im Anschluss an das Messintervall mit veränderter Soll-Temperatur wurde überprüft, ob temperaturinduzierte Veränderungen der KSF reversibel sind. Messungen der KSF fanden in den Minuten 60, 66, 72, 75 und 94 statt. Als Kontrollen (30 °C, n = 5) dienten Versuche mit einer während der gesamten Versuchsdauer konstanten Temperatur von 30 °C.

2.7 Versuche zur PTG

2.7.1 Messung der PTG

Die Bestimmung der PTG erfolgte mit Hilfe von Dynabeads (Invitrogen Dynal, Oslo, Norwegen) mit einer durchschnittlichen Größe von circa 2,8 µm, die bei einer Temperatur von 6 °C gelagert wurden. Gemessen wurde die Geschwindigkeit mit der die Dynabeads innerhalb der entnommenen Trachea transportiert wurden. Vor Zugabe in das Medium wurden diese für einige Sekunden mit 1400 g gevortext. Jeweils 3 µl wurden 5 Minuten vor Beginn der Messreihe in Minute 25 an den Rand des T-Dish, seitlich der

aufgespannten Trachea, gebracht und durch mehrfaches Mischen mit der Pipette derart in der Pufferlösung verteilt, dass keine Agglomerate am Schälchenboden mehr sichtbar waren. Das Objektiv mit 20ig-facher Vergrößerung wurde nun auf einen zwischen 2 Knorpelspangen befindlichen Kinozilien-tragenden Bereich des Epithels gerichtet. Der einmal gewählte Bildausschnitt wurde konstant für die gesamte Dauer des Versuchs beibehalten. Es wurde dann eine Fokusebene gewählt, die eine möglichst scharfe Darstellung des Partikeltransports ermöglichte. Die Messung der PTG erfolgte während der Versuche zu den vorher festgesetzten Messzeitpunkten (siehe Kapitel 2.5). Jeweils 90 Sekunden vor Beginn einer neuen Aufnahme wurden die Dynabeads erneut für 30 Sekunden mit der Pipette durchmischt, um Agglomeratbildungen, die zu Fehlern in der Auswertung führen könnten, zu vermeiden und gleichzeitig die Temperatur innerhalb des T-Dish zu vereinheitlichen. Jeweils eine Minute vor Aufzeichnungsbeginn wurde das Pipettieren unterbrochen, um die gemessenen PTG nicht zu verfälschen.

2.7.2 Versuche zur Temperaturabhängigkeit der PTG und zur ziliären Grundaktivität

Um den Einfluss passagerer Temperaturveränderungen auf die PTG zu untersuchen, erfolgten Experimente mit einmaliger bzw. zweimaliger passagerer Veränderung der Soll-Temperatur. Die Versuche fanden in Ca^{2+} -haltiger HEPES-Ringer-Pufferlösung statt. Einmalige Veränderungen der Soll-Temperatur erfolgten im Messintervall zwischen Minute 60 und Minute 72. Die Temperaturveränderung erfolgte dabei direkt im Anschluss an die Messung in Minute 60 von ursprünglich 30 °C auf 22 °C (V-22 °C, n = 3), 26 °C (V-26 °C, n = 5), 34 °C (V-34 °C, n = 3), 37 °C (V-37 °C, n = 4), bzw. 41 °C (V₁-41 °C, n = 3, siehe Abbildung 11A). Bei Versuchen in denen die Auswirkung wiederholter passagerer Temperaturveränderungen auf die PTG untersucht wurde (V₂-41 °C, n = 3), erfolgte eine erste passagere Temperaturerhöhung von 30 °C auf 41 °C im Messintervall zwischen Minute 60 und 69. Direkt im Anschluss an die Messung in Minute 69 wurde die Soll-Temperatur für die Messungen in Minute 72 und 75 erneut auf 30 °C eingestellt. Die Messungen in Minute 78, 81 und 84 fanden dann aufs Neue bei einer Soll-Temperatur von 41 °C statt. Im Messintervall ab Minute 84 bis 100 betrug die Soll-Temperatur konstant 30 °C (siehe Abbildung 11C). Als Kontrollen (n = 5) dienten Versuche mit über die gesamte Versuchslänge konstanter Temperatur von 30 °C.

Um zusätzlich die Bedeutung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bei der Vermittlung des beobachteten temperaturabhängigen Effekts auf die PTG zu untersuchen, wurden außerdem Versuche mit einmaliger ($V_{1B-41} \text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 3$) oder zweimaliger ($V_{2B-41} \text{ }^{\circ}\text{C}$, $n = 3$) Veränderung der Versuchstemperatur in Ca^{2+} -freier HEPES-Ringer-Pufferlösung durchgeführt, bei denen zusätzlich EGTA (Minute 25, 1 mM) und BAPTA/AM (Minute 60, 10 μM) appliziert wurde (siehe Abbildungen 11B und 11C). Einmalige passagere Veränderungen der Versuchstemperatur von ursprünglich 30 $^{\circ}\text{C}$ auf 41 $^{\circ}\text{C}$ fanden, um eine mögliche Latenz im Wirkeintritt von BAPTA/AM (Minute 60, 10 μM) zu berücksichtigen, im Messintervall zwischen Minute 75 bis 84 statt. Zu den übrigen Messzeitpunkten betrug die Temperatur im Medium konstant 30 $^{\circ}\text{C}$. Zweimalige vorübergehende Veränderungen der Versuchstemperatur fanden im Messintervall zwischen Minute 60 und 69 sowie, im Anschluss an ein Beobachtungsintervall unter der ursprünglichen Soll-Temperatur von 30 $^{\circ}\text{C}$ (in Minute 72 und 75), zwischen Minute 75 und 84 statt. Als Kontrollen ($n = 3$) dienten zum einen Versuche bei konstanter Temperatur von 30 $^{\circ}\text{C}$ mit Zugabe von BAPTA/AM (Minute 60, 10 μM) und zum anderen Versuche mit entsprechender einmaliger oder zweimaliger Veränderung der Versuchstemperatur, bei denen jedoch keine Applikation von BAPTA/AM erfolgte. Um ferner die Einbindung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bei der Aufrechterhaltung der ziliären Grundaktivität zu untersuchen wurden, außerdem Versuche mit über die gesamte Versuchslänge konstanter Temperatur von 30 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, bei denen ebenfalls BAPTA/AM (Minute 60, 10 μM) und EGTA (Minute 25, 1 mM) appliziert wurden. Als Kontrollen dienten entsprechende Versuche ohne Applikation von BAPTA/AM.

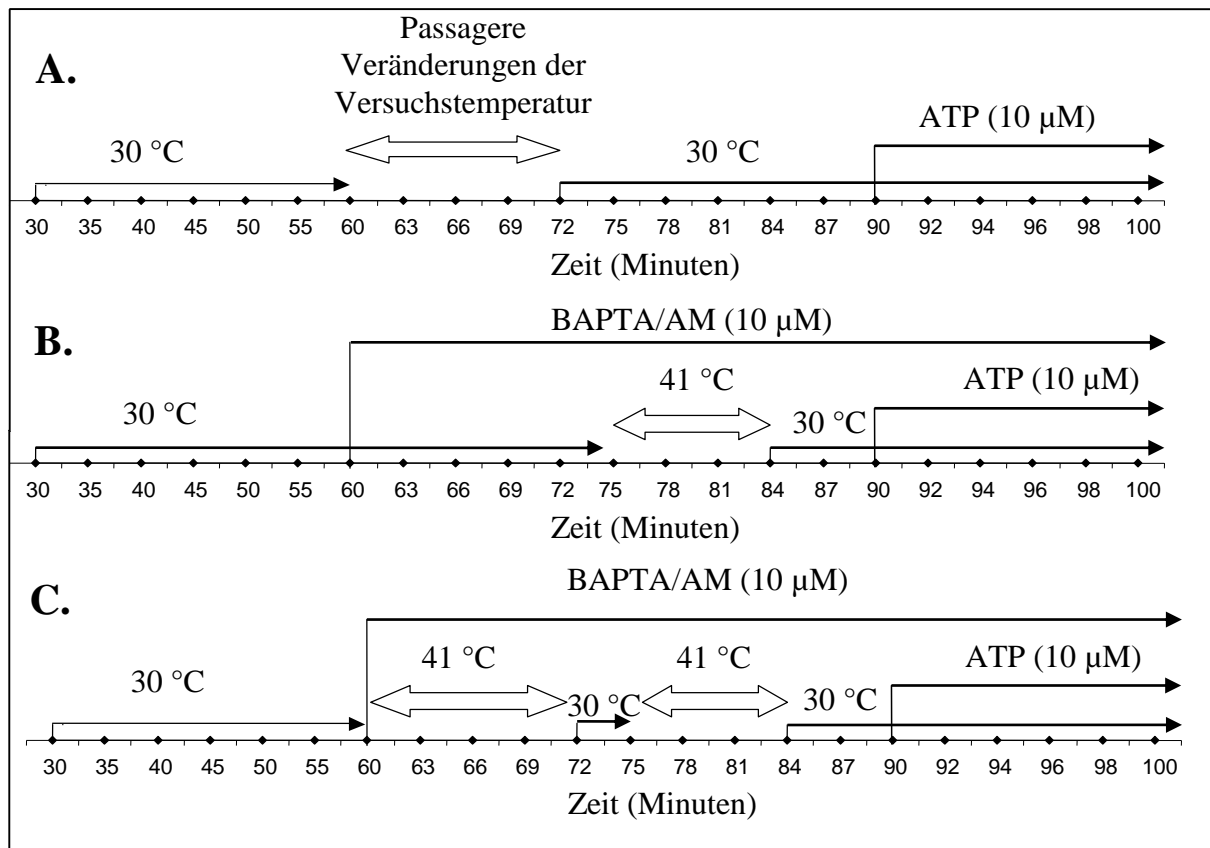


Abbildung 11: Versuchsschema

A: Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der Versuche zur KSF bzw. PTG mit einmaliger Temperaturerhöhung im Messintervall zwischen Minute 60 und 72. Als Kontrollen dienten Versuche mit über die gesamte Versuchsdauer konstanter Temperatur von 30 °C (n = 6).

B: Die Abbildung veranschaulicht den Ablauf der Versuche zur PTG mit einmaliger Erhöhung der Versuchstemperatur auf 41 °C im Messintervall zwischen Minute 75 bis 84 und zusätzlicher Applikation von EGTA (1 mM, Minute 25) und BAPTA/AM (10 µM, Minute 60). Als Kontrollen dienten Versuche bei konstanter Temperatur von 30 °C (n = 3) bzw. Versuche mit entsprechender Veränderung der Temperatur ohne Applikation von BAPTA/AM (n = 3).

C: Die Abbildung zeigt den Ablauf der Versuche zur PTG mit zweimaliger Temperaturerhöhung auf 41 °C im Messintervall zwischen Minute 60 bis 69 bzw. Minute 75 bis 84 (n = 3). Bei den Versuchen, in denen die Bedeutung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen für die Vermittlung des temperaturbedingten Effekts auf die PTG untersucht wurde, erfolgte zusätzlich die Applikation von EGTA (1 mM, Minute 25) und BAPTA/AM (10 µM, Minute 60). Als Kontrollen dienten Versuche bei konstanter Temperatur von 30 °C (n = 5) bzw. Versuche mit entsprechender Veränderung der Temperatur ohne Applikation von BAPTA/AM (n = 3).

2.8 Digitale Auswertung

2.8.1 Digitale Auswertung der Versuche zur PTG

Die digitale Auswertung der Partikeltransportversuche erfolgte nach Versuchsende mit Hilfe der Software „Image Pro Plus“ (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA). Um die PTG quantifizieren zu können, wurden die Bilder zunächst ausgehend von einer 12 bit Graustufe in eine 8 bit Graustufe umgewandelt und einer Hintergrundbereinigung

unterzogen. Von allen Bildern eines Filmes wurde zunächst ein Durchschnittsbild berechnet, welches im Anschluss von allen vorliegenden Bildern eines Filmes abgezogen wurde. Auf diese Weise konnten bewegliche von unbeweglichen Partikeln differenziert werden. Dies ermöglichte es der Software schließlich an Hand der durch die Bewegung der Dynabeads verursachten Änderung der Graustufen im zeitlichen Verlauf sowohl die Geschwindigkeit als auch die Verlaufsrichtung der durch die Kinozilien des Flimmerepithels transportierten Dynabeads (Tracks) zu bestimmen. Im Anschluss wurde die Richtigkeit der durch die Software identifizierten Tracks verifiziert. Fälschlicherweise von der Software als Dynabeads identifizierte Bindegewebsreste oder Partikel wurden als Stör-Tracks manuell am Computer eliminiert. Aus der Summe der gefundenen Tracks und der jeweils zurückgelegten Distanz (d) errechnete die Software die Durchschnittsgeschwindigkeit aller Partikel und derjenigen Partikel, deren Wegstrecken nicht mehr als 15% von der am kürzesten möglichen abwichen (MW 15%, $v=d/(t_2-t_1)$; t =Zeit).

Für eine aussagekräftige Auswertung der Partikeltransportversuche wurde eine ausreichende Anzahl von beweglichen Partikeln vorausgesetzt. Versuche mit < 40 gefundener Partikel wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen.

2.8.2 Digitale Auswertung der Versuche zur KSF

Die KSF wurde mit Hilfe der beiden Programme „Image Pro Plus“ und „AutoSignal v. 1,7“ (SYSTAT Software GmbH, Erkrath) ermittelt. Mittels Image Pro Plus wurden auf dem Startbild einer jeden aufgenommenen Sequenz zu einem bestimmten Messzeitpunkt 8 Areale besonders dicht stehender Kinozilien-tragender Areale durch Umkreisen ausgewählt. Diese sog. „areas of interest“ (AOI) wurden in allen zu verschiedenen Messzeitpunkten aufgenommenen Sequenzen eines Versuchs identisch ausgewählt. Für jede der 8 AOI pro aufgenommener Sequenz wurde dann die KSF ermittelt. Die Software erkannte dafür die durch den Zilienschlag verursachte Änderung der Graustufen im zeitlichen Verlauf. Mit Hilfe einer Fast Fourier Transformation, die mit der Software „AutoSignal v. 1,7“ durchgeführt wurde, konnte aus den zuvor ermittelten Werten die dominante Frequenz als KSF errechnet werden. Aus den 8 KSF pro aufgenommener Sequenz wurde dann der Mittelwert berechnet.

2.9 Auswertung der Versuche und Statistik

Aus den gemessenen Rohdaten wurden zunächst die Mittelwerte (MW) und die zugehörigen Standardabweichungen (SD) berechnet. Die im Ergebnisteil angegebenen Messwerte repräsentieren also stets Mittelwerte. Grundlage sind die im Rahmen der digitalen Auswertung der Versuche berechneten KSF und PTG derjenigen Partikel, deren Wegstrecken zwischen Start- und Endpunkt der Messung nicht mehr als 15% von der am kürzesten möglichen abweichen (MW 15%). Während der Auswertung der Versuche fielen unterschiedliche PTG bzw. KSF zu Versuchsbeginn auf. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Versuche zu ermöglichen wurden die berechneten PTG und KSF auf den jeweiligen Basiswert (Minute 60, siehe Kapitel 2.4) des Versuchs bezogen. Die PTG bzw. KSF in Minute 60 wurde als Referenzwert auf 100% gesetzt und die prozentuale Abweichung von diesem Wert zu jedem Messzeitpunkt berechnet. Kontrollversuche mit konstanten Versuchsbedingungen ab Messminute 60 und Versuche, bei denen Änderungen der Versuchsbedingungen im Messintervall zwischen Minute 60 bis 90 erfolgt waren, wurden dann zu Vergleichsgruppen zusammengefasst und im Folgenden auf statistisch signifikante Unterschiede bezüglich ihrer PTG oder KSF überprüft. Graphisch dargestellt wurden die Versuche im Anschluss mittels „Microsoft Office Excel 2003“ und „Microsoft PowerPoint 2003“ (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Die graphische Darstellung der Versuche beschränkt sich dabei auf das Messintervall zwischen Minute 60 und 100, in dem Veränderungen des Versuchsablaufs stattfanden. Dargestellt sind jeweils die KSF bzw. PTG derjenigen Partikel, die nicht mehr als 15% vom idealen Weg abweichen, bezogen auf den Basiswert in Minute 60 mit zugehöriger SD. Die Ergebnisse wurden zusätzlich als Boxplots mit den Median, Minimum- und Maximumwerten und den Perzentilen 25 und 75 dargestellt.

Berechnung des Q_{10} -Werts

Um den Zusammenhang zwischen der passageren Veränderung der Versuchstemperatur und der ziliären Aktivität abzuschätzen, wurde der Q_{10} -Wert bestimmt. Der Q_{10} -Wert ist der Faktor, um den die Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion steigt, wenn die Temperatur um 10 °C zunimmt. Je größer dieser Wert, desto stärker die Temperaturabhängigkeit. Die Berechnung des Wertes erfolgte durch die Formel $Q_{10} = (R_2/R_1)^{10/(T_2-T_1)}$ berechnet, wobei R_1 die PTG bei der Temperatur T_1 und R_2 die PTG bei der Temperatur T_2 ist. Es gilt $T_1 < T_2$.

Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „GraphPad Prism“ (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Die Ergebnisse wurden einer explorativen Datenanalyse unterzogen. Die Versuche zum Einfluss von Temperatur auf die PTG bzw. KSF wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Test und des Mann-Whitney-Tests statistisch ausgewertet. Die statistische Auswertung der Versuche, in denen die Auswirkung der Chelatierung intra- und extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen durch die kombinierte Applikation von BAPTA/AM und EGTA auf die PTG untersucht wurde, erfolgte aufgrund des kleineren Stichprobenumfangs mit dem Two-way-Anova-Test. Beobachtete Differenzen im Vergleich zu den Kontrollversuchen zu den entsprechenden Messzeitpunkten wurden bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant eingestuft.

3 Ergebnisse

3.1 Temperaturabhängigkeit der KSF

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss einer passageren Temperaturveränderung (Messintervall Minute 60 bis 72) von ursprünglich 30 °C auf 22 °C (V-22 °C, n = 4) bzw. 41 °C (V-41 °C, n = 4) auf die ziliäre Aktivität direkt durch Messung der KSF untersucht (siehe Kapitel 2.6). Als Kontrollversuche (30 °C, n = 5), die für den statistischen Vergleich herangezogen wurden, dienten Versuche, die bei einer über die gesamte Versuchslänge konstanten Temperatur von 30 °C durchgeführt wurden.

Zum Messzeitpunkt in Minute 66 betrug die Ist-Temperatur innerhalb des Puffermediums 23,7 °C. Zeitgleich wurde die KSF mit $8 \pm 1,8$ Hz (65%, der angegebene Prozentwert beschreibt jeweils die errechnete prozentuale Abweichung des Messwerts von dem entsprechenden Basiswert der KSF bzw. PTG in Minute 60 als Referenz, siehe Kapitel 2.9) gemessen. Im Vergleich mit den Kontrollversuchen zeigte sich die KSF dabei statistisch signifikant erniedrigt (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$). In der folgenden Messung in Minute 72 erreichte die ziliäre Aktivität bei einer Ist-Temperatur von 22 °C innerhalb des Mediums mit $7 \pm 1,8$ Hz (57%) ihre minimale Frequenz, die sich weiterhin von der KSF der Kontrollversuche zum entsprechenden Messzeitpunkt unterschied (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$). Im Anschluss an die Messung erfolgte die Wiedereinstellung der initialen Soll-Temperatur von 30 °C. In Minute 75 wurde bei einer Ist-Temperatur von 29,1 °C die KSF mit $10,8 \pm 2,2$ Hz (89%) bestimmt. Ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen konnte dabei nicht festgestellt werden (Mann-Whitney-Test, $p = 1$, siehe Abbildungen 12A und 12C).

Während die passagere Reduktion der Versuchstemperatur mit einem vorübergehenden Absinken der KSF einhergegangen war, wurde in einer zweiten Versuchsreihe der Einfluss einer passageren Erhöhung der Versuchstemperatur (41 °C) auf die KSF untersucht. Zum Messzeitpunkt in Minute 66 wurde bei einer Ist-Temperatur von 40,7 °C innerhalb des Mediums die maximale KSF unter erhöhter Temperatur mit $23,6 \pm 2,8$ Hz (225%) ermittelt, die sich von der KSF der Kontrollversuche (30 °C) zum entsprechenden Messzeitpunkt unterschied (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$). Auch in der Folgemessung (Minute 72) blieb die KSF bei einer Ist-Temperatur von 41 °C im Medium auf erhöhtem Niveau im Vergleich mit den Kontrollversuchen zum entsprechenden Messzeitpunkt (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$).

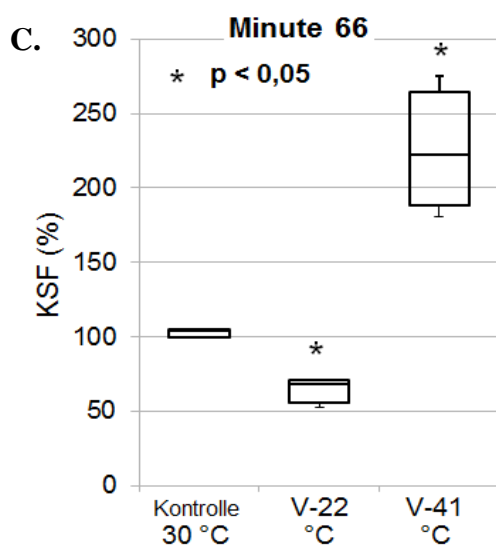
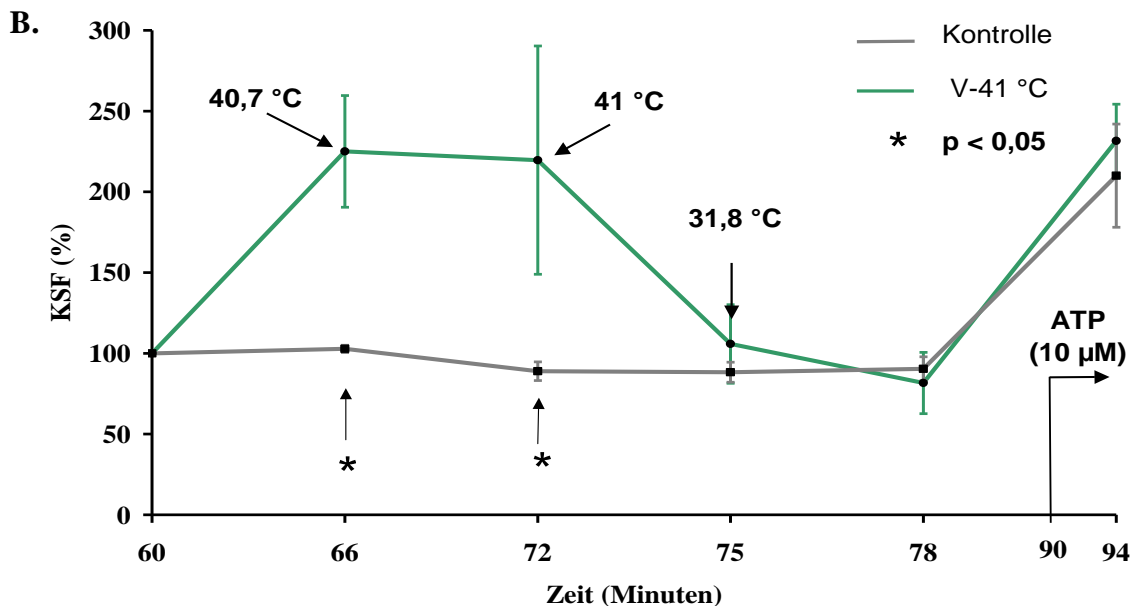
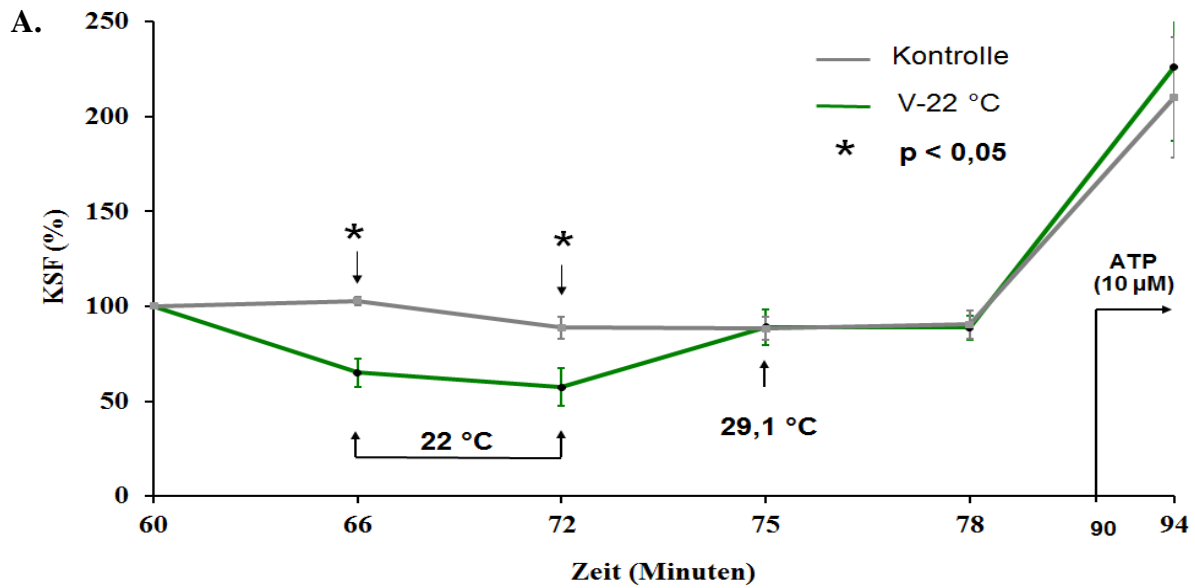


Abbildung 12: Vergleichende Darstellung der KSF bei konstanter Temperatur von 30 °C (Kontrollversuche, $n = 5$) und einer passageren Veränderung der Versuchstemperatur auf 22 °C (A, $n = 4$) bzw. 41 °C (B, $n = 4$) im Messintervall zwischen Minute 60 und 72.

Dargestellt sind die KSF (bezogen auf Minute 60 als Referenz) und die zugehörigen SD. Die Ist-Temperaturen innerhalb des Mediums zu den jeweiligen Messzeitpunkten sind in den Abbildungen durch Pfeile markiert. Die Zugabe von ATP (10 µM) erfolgte direkt im Anschluss an die Messung in Minute 90. Die Versuche wurden nach 100 Minuten beendet. C. zeigt eine vergleichende Darstellung der KSF zum Messzeitpunkt Minute 66. Die Boxplots zeigen den Median, die Minimum- und Maximumwerte sowie die Perzentilen 25 und 75. Beobachtete Differenzen im Vergleich zu den Kontrollversuchen zum entsprechenden Messzeitpunkt mit $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) wurden als statistisch signifikant angegeben (* $p < 0,05$).

Wie bereits bei den Versuchen mit passagerer Temperaturreduktion auf 22 °C beobachtet, war der Einfluss der vorübergehenden Temperaturerhöhung auf die KSF nach deren Beendigung ebenfalls reversibel. Nach Wiedereinstellen der ursprünglichen Soll-Temperatur von 30 °C am Thermostaten im Anschluss an die Messung in Minute 72 wurde zum folgenden Messzeitpunkt in Minute 75 bei einer Ist-Temperatur von 31,8 °C die KSF mit $11 \pm 1,9$ Hz (106%) bestimmt. Ein Unterschied im Vergleich mit den Kontrollversuchen konnte dabei nicht festgestellt werden (Mann-Whitney-Test, $p = 0,5556$, siehe Abbildungen 12B und 12C).

Die Applikation von ATP (10 μ M) führte in allen Versuchsreihen zu einer Stimulation der KSF. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bezüglich der KSF konnten dabei nicht festgestellt werden (siehe Abbildungen 12A und 12B).

3.2 Temperaturabhängigkeit der PTG

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss einer passageren einmaligen oder zweimaligen Veränderung der Versuchstemperatur auf die ziliäre Funktion durch Messung der Transportgeschwindigkeit von Dynabeads (PTG) innerhalb der Trachea quantifiziert.

Die Versuche wurden in Ca^{2+} -haltiger HEPES-Ringer-Pufferlösung durchgeführt. Versuche mit über die gesamte Versuchsdauer konstanter Temperatur von 30 °C dienten als Kontrollen ($n = 6$). Die abschließende Applikation von ATP (10 μ M) führte in allen Versuchsreihen zu einer Zunahme der PTG.

3.2.1 Auswirkung einer passageren Temperaturerniedrigung auf 22 °C bzw. 26 °C auf die PTG

Die Reduktion der Versuchstemperatur auf 22 °C im Messintervall zwischen Minute 60 und Minute 72 führte zu einem funktionellen Stillstand der PTG, in der bewegliche Partikel nicht in für die Auswertung ausreichender Anzahl gefunden wurden (siehe Kapitel 2.8).

Die schrittweise Reduktion der Versuchstemperatur auf 26 °C (V-26 °C, $n = 5$) im Messintervall zwischen Minute 60 und 72 hingegen führte zu einer messbaren Reduktion der PTG im Vergleich zu den Kontrollversuchen. Zum Messzeitpunkt in Minute 63 betrug die Ist-Temperatur im Medium gleichmäßig 27,2 °C. Gleichzeitig wurde die PTG mit $33,8 \pm 3,5$ μ m/s (71%) bestimmt. Dabei fand sich ein Unterschied (Mann-Whitney-

Test, $p < 0,05$) im Vergleich zu der PTG der Kontrollversuche zum entsprechenden Messzeitpunkt. Im Messintervall zwischen Minute 66 bis 72 betrug die Ist-Temperatur innerhalb des Mediums konstant 26 °C. Dies resultierte in einem basalen Plateau der PTG. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe konnten Unterschiede (Mann-Whitney-Test) bezüglich der PTG zum Messzeitpunkt Minute 66 ($29,1 \pm 3,3 \mu\text{m/s}$, 61%, Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$) und Minute 72, in der die minimale PTG unter der Soll-Temperatur von 26 °C mit $28 \pm 3,9 \mu\text{m/s}$ (59%, Mann-Whitney-Test $p < 0,01$) gemessen wurde, festgestellt werden. In Minute 69 wurde trotz der Temperaturdifferenz von 4 °C kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen beobachtet, es zeigte sich jedoch eine tendenziell geringere PTG bei den Versuchen, die bei einer Soll-Temperatur von 26 °C ($28,9 \pm 3,9 \mu\text{m/s}$, Mann-Whitney-Test, $p = 0,0649$) durchgeführt wurden.

Im Anschluss an die Messung in Minute 72 erfolgte am Thermostaten die Wiedereinstellung der ursprünglichen Soll-Temperatur von 30 °C. Zum folgenden Messzeitpunkt (Minute 75, 29,4 °C) wurde ein Anstieg der PTG ($39,2 \pm 2,6 \mu\text{m/s}$, 82%) auf das Geschwindigkeitsniveau des Ausgangswertes vor Temperaturveränderung (Minute 60) beobachtet (Mann-Whitney-Test, $p = 0,238$, siehe Abbildungen 13A und 14C).

3.2.2 Auswirkung einer passageren einmaligen Temperaturerhöhung auf 34 °C, 37 °C bzw. 41 °C auf die PTG

Um den Einfluss einer passageren einmaligen Temperaturerhöhung (Messintervall zwischen Minute 60 und 72, siehe Kapitel 2.7) auf die PTG zu untersuchen, erfolgten Temperaturveränderungen von ursprünglich 30 °C auf 34 °C ($n = 3$, V-34 °C) bzw. 37 °C ($n = 4$, V-37 °C). Um zusätzlich Aussagen bezüglich des Einflusses pathophysiologischer Temperaturen, wie sie beispielsweise bei Veränderungen der Körperkerntemperatur im Rahmen von Infektionen bzw. Entzündungen vorliegen, auf die PTG treffen zu können, erfolgten Versuche mit vorübergehender Temperaturveränderungen auf 41 °C ($n = 3$, V₁-41 °C).

Nach Änderung der Soll-Temperatur auf 34 °C im Anschluss an die Messung in Minute 60 wurde zum folgenden Messzeitpunkt in Minute 63 bei einer Ist-Temperatur von 32,8 °C innerhalb des Mediums eine PTG von $49,8 \pm 2,2 \mu\text{m/s}$ (137%) gemessen. Im Vergleich zu der PTG der Kontrollversuche zum entsprechenden Messzeitpunkt zeigte sich die PTG dabei statistisch signifikant erhöht (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$).

Im sich anschließenden Beobachtungsintervall (Minute 63 bis 72) betrug die Ist-Temperatur im Medium konstant 34 °C. In Minute 66 wurde die PTG dabei mit $44,3 \pm 5,7 \mu\text{m/s}$ bestimmt (120%, Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$). In Minute 69 und Minute 72 wurde die PTG dann mit $39,2 \pm 5 \mu\text{m/s}$ (107%, Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$) bzw. mit $36,8 \pm 3,6 \mu\text{m/s}$ (100%, Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$) ermittelt (siehe Abbildungen 13B und 14C).

In einer zweiten Versuchsreihe bewirkte die Erhöhung der Soll-Temperatur von ursprünglich 30 °C auf 37 °C während desselben Beobachtungsintervall sowohl einen schnelleren Anstieg der PTG als auch tendenziell höhere maximale PTG als bei den Versuchen mit passagerer Temperaturerhöhung auf 34 °C (siehe Abbildung 14C). In der Messung in Minute 63 betrug die PTG bei einer Ist-Temperatur von 35 °C innerhalb des Mediums $56,8 \pm 5,4 \mu\text{m/s}$ (157%) und unterschied sich damit von der PTG der Kontrollversuche zum gleichen Messzeitpunkt (Mann-Whitney-Test, $p < 0,01$). Im folgenden Messintervall bis Minute 72 erreichte der Partikeltransport bei einer konstanten Temperatur von 37 °C im Medium ein Geschwindigkeitsplateau, das sich weiterhin von den PTG der Kontrollversuche zu den jeweils entsprechenden Messzeitpunkten unterschied. Die maximale PTG wurde bei einer Temperatur von 37 °C im Medium in Minute 66 mit $61,5 \pm 7,3 \mu\text{m/s}$ (170%, Mann-Whitney-Test, $p < 0,01$) gemessen. In Minute 69 und Minute 72 betrug die PTG $59,6 \pm 6,7 \mu\text{m/s}$ (165%, Mann-Whitney-Test, $p < 0,01$) bzw. $55,8 \pm 8,7 \mu\text{m/s}$ (155%, Mann-Whitney-Test, $p < 0,01$, siehe Abbildungen 13C und 14C).

Bei passagerer Anhebung der Soll-Temperatur auf pathophysiologische 41 °C wurden die insgesamt schnellsten PTG unter erhöhter Versuchstemperatur gemessen. Bei einer Ist-Temperatur von 35,7 °C innerhalb des Mediums betrug die PTG zum Messzeitpunkt in Minute 63 $69 \pm 7,2 \mu\text{m/s}$ (185%) und unterschied sich damit von den PTG der Kontrollversuche zum entsprechenden Messzeitpunkt (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$). In der Folgemessung wurde bei einer Ist-Temperatur von 40,7 °C im Medium die maximale PTG unter erhöhter Temperatur mit $93,7 \pm 3,2 \mu\text{m/s}$ (257%) bestimmt, die sich ebenfalls von der PTG der Kontrollversuche unterschied (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$). In den Messungen in Minute 69 und 72 erreichte der Partikeltransport dann bei einer konstanten Ist-Temperatur von 41 °C im Medium ein Geschwindigkeitsplateau, wobei die PTG tendenziell leicht unterhalb der maximalen PTG (Minute 66) lagen. Im Vergleich zu den Kontrollversuchen fanden sich auch in Minute 69 $90,5 \pm 5,4 \mu\text{m/s}$, 245%, Mann-

Whitney-Test, $p < 0,05$) und Minute 72 ($84,2 \pm 2,9 \mu\text{m/s}$, 231%, Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$) Unterschiede bezüglich der PTG (siehe Abbildungen 14A und 14C).

Der Einfluss der passageren Temperaturveränderung zeigte sich in allen Versuchsreihen nach Rückführung der Versuchstemperatur auf die Ausgangstemperatur von 30°C reversibel. Im Anschluss an das Messintervall (Minute 60 bis 72) mit erhöhter Soll-Temperatur (34°C , 37°C bzw. 41°C) erfolgte bei allen Versuchen direkt nach der Messung in Minute 72 am Thermostaten die Wiedereinstellung der ursprünglichen Soll-Temperatur von 30°C . Bis zum folgenden Messzeitpunkt in Minute 75 erfolgte eine passive Abkühlung der Temperatur innerhalb des Mediums. Die Ist-Temperaturen innerhalb des Mediums wurden zum Messzeitpunkt Minute 75 wie folgt bestimmt: $30,8^\circ\text{C}$ (V- 34°C), $31,2^\circ\text{C}$ (V- 37°C) bzw. $31,8^\circ\text{C}$ (V₁- 41°C). Zum Messzeitpunkt Minute 75 wurden zeitgleich die PTG mit $26,2 \pm 3,2 \mu\text{m/s}$ (72%, V- 34°C), $27 \pm 3,5 \mu\text{m/s}$ (75%, V- 37°C) bzw. $32,8 \pm 2 \mu\text{m/s}$ (89%, V₁- 41°C) ermittelt. Unterschiede im Vergleich mit den Kontrollversuchen zum entsprechenden Messzeitpunkt ließen sich nicht feststellen (V- 34°C : $p = 0,381$, V- 37°C : $p = 0,4762$, V₁- 41 : $p = 0,2619$, siehe Abbildungen 13 und 14).

Insgesamt fanden sich tendenziell schnellere PTG nach passagerer Veränderung der Versuchstemperatur auf höhere Soll-Temperaturen ($41^\circ\text{C} > 37^\circ\text{C} > 34^\circ\text{C}$), statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der PTG konnte jedoch nicht festgestellt werden. Der Q_{10} -Wert wurde zum Messzeitpunkt Minute 66 im Temperaturintervall zwischen 34°C (T_1) und 41°C (T_2) mit 2,76 berechnet. In dem untersuchten Temperaturintervall besteht ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen Temperatur und ziliärer Transportleistung.

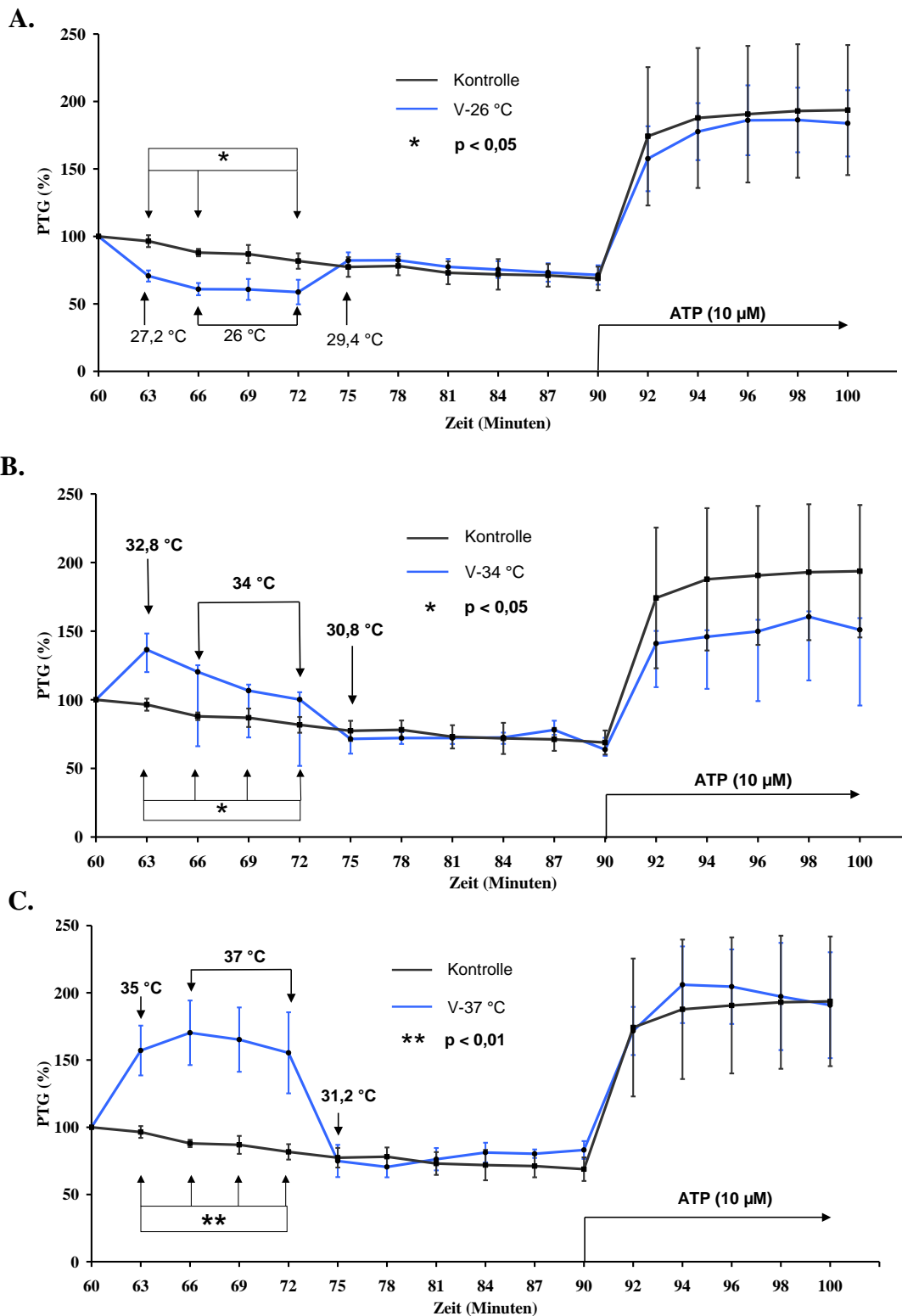


Abbildung 13: Vergleichende Darstellung der PTG (bezogen auf Minute 60 als Referenz) bei konstanter Temperatur von 30 °C (Kontrollversuche, $n = 6$) und einer passageren Veränderung der Versuchstemperatur auf 26 °C (A, $n = 5$), 34 °C (B, $n = 3$) bzw. 37 °C (C, $n = 4$) im Messintervall zwischen Minute 60 und 72.

Dargestellt sind die PTG (MW 15%) und die zugehörigen SD. Die Ist-Temperaturen innerhalb des Mediums zu den jeweiligen Messzeitpunkten sind in den Abbildungen durch Pfeile markiert. Die Zugabe von ATP (10 μM) erfolgte direkt im Anschluss an die Messung in Minute 90. Die Versuche wurden nach 100 Minuten beendet. Beobachtete Differenzen im Vergleich zu den Kontrollversuchen zum entsprechenden Messzeitpunkt mit $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) wurden als statistisch signifikant angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

3.2.3 Auswirkung einer wiederholten passageren Temperaturerhöhung auf 41 °C auf die PTG

In dieser Versuchsreihe wurde die Auswirkung einer wiederholten passageren Änderung der Versuchstemperatur auf 41 °C (V_2 -41 °C, $n = 3$) auf die PTG beobachtet, um so zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß sich temperaturbedingte Veränderungen der PTG wiederholen lassen. Passagere Veränderungen der Soll-Temperatur von vorausgehend 30 °C auf 41 °C fanden im Beobachtungsintervall zwischen Minute 60 und 69 sowie zwischen Minute 75 und 84 statt (siehe Abbildungen 14B und 14C). Zum Messzeitpunkt Minute 63 betrug die PTG bei einer Ist-Temperatur im Medium von 35,7 °C $64,4 \pm 7,9 \mu\text{m/s}$ (194%) und unterschied sich damit von der PTG der Kontrollgruppe zum selben Messzeitpunkt (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$). Die insgesamt maximale PTG unter auf 41 °C erhöhter Soll-Temperatur wurde mit $95,2 \pm 3,4 \mu\text{m/s}$ (285%) in Minute 66 bei einer Ist-Temperatur von 40,7 °C im Medium gemessen. Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollversuchen fanden sich zum Messzeitpunkt Minute 66 ($95,2 \pm 3,4 \mu\text{m/s}$, 285%, Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$) und 69 ($85,6 \pm 8,9 \mu\text{m/s}$, 260%, Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$).

Im Anschluss an die Messung in Minute 69 erfolgte die Änderung der Soll-Temperatur am Thermostaten auf 30 °C. In den Folgemessungen (Minute 72 bzw. 75) betrug die Ist-Temperatur im Medium 31,8 °C bzw. 30 °C, zeitgleich wurden die PTG mit $33 \pm 6,3 \mu\text{m/s}$ (99%, Minute 72) bzw. $32,6 \pm 5,3 \mu\text{m/s}$ (99%, Minute 75) ermittelt. Unterschiede bezüglich der PTG im Vergleich mit den Kontrollversuchen fanden sich nicht (Mann-Whitney-Test, $p = 0,2619$ in Minute 72 bzw. $p = 0,381$ in Minute 75).

Im Messintervall zwischen Minute 75 und 84 erfolgte eine erneute passagere Veränderung der Versuchstemperatur auf eine Soll-Temperatur von 41 °C. Zum Messzeitpunkt Minute 78 wurde die PTG bei einer Ist-Temperatur im Medium von 35,7 °C mit $55,3 \pm 5$ (167%) $\mu\text{m/s}$ bestimmt. Die maximale PTG während der zweiten Temperaturerhöhung (41 °C) wurde zum Messzeitpunkt Minute 81 bei einer Ist-Temperatur von 41 °C im Medium mit $85,8 \pm 5,3 \mu\text{m/s}$ (259%) gemessen. Unterschiede bezüglich der PTG im Vergleich zu den Kontrollversuchen zu den jeweils entsprechenden Messzeitpunkten fanden sich insgesamt in den Messungen in Minute 78 (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$), 81 (Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$) und 84 ($73,1 \pm 12,2$, 222,9%, Mann-Whitney-Test, $p < 0,05$).

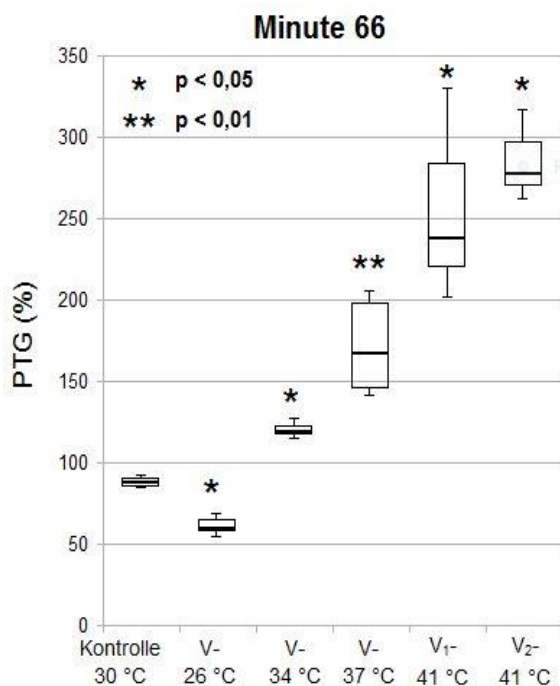
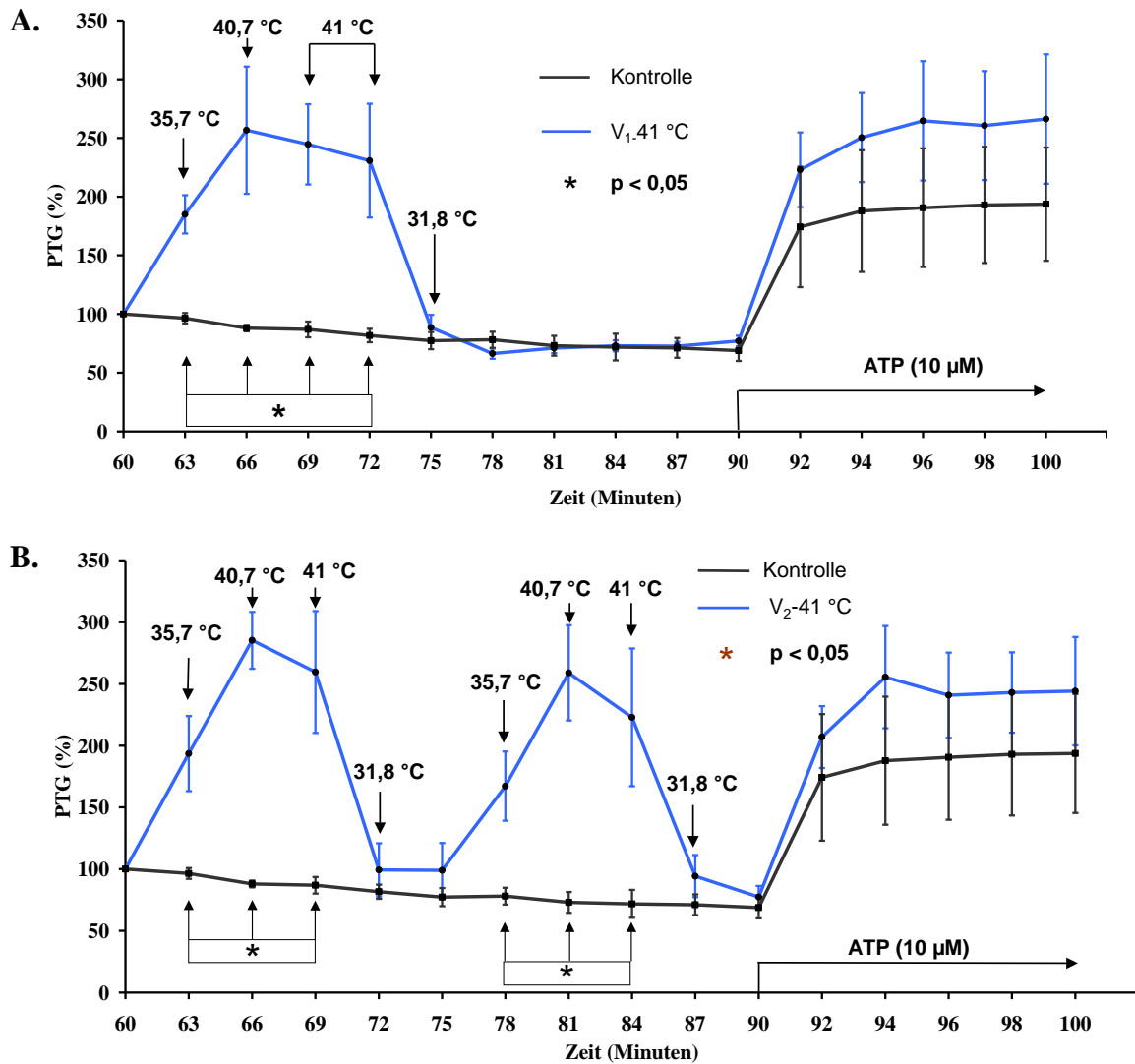


Abbildung 14: Vergleichende Darstellung der PTG (bezogen auf Minute 60 als Referenz) bei konstanter Temperatur von 30 °C (Kontrollversuche, $n = 6$) und einer passageren einmaligen (A, $n = 4$) bzw. zweimaligen (B, $n = 3$) Veränderung der Versuchstemperatur auf 41 °C im Messintervall zwischen Minute 60 und 90. Dargestellt sind die PTG (MW 15%) und die zugehörigen SD. Die Ist-Temperaturen innerhalb des Mediums zu den jeweiligen Messzeitpunkten sind in den Abbildungen durch Pfeile markiert. Die Zugabe von ATP (10 μM) erfolgte direkt im Anschluss an die Messung in Minute 90. Die Versuche wurden nach 100 Minuten beendet. C zeigt eine vergleichende Darstellung der PTG zum Messzeitpunkt Minute 66 bei einer Soll-Temperatur von 26 °C, 30 °C, 34 °C, 37 °C und 41 °C. Die Boxplots zeigen den Median, die Minimum- und Maximumwerte sowie die Perzentilen 25 und 75. Beobachtete Differenzen im Vergleich zu den Kontrollversuchen zum entsprechenden Messzeitpunkt mit $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) wurden als statistisch signifikant angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Insgesamt konnte kein Unterschied im Ausmaß der Steigerbarkeit der PTG durch die passagere Temperaturerhöhung auf 41 °C zwischen der ersten bzw. zweiten Temperaturveränderung festgestellt werden.

Nach Wiedereinstellen einer Soll-Temperatur von 30 ° im Anschluss an die Messung in Minute 84 betrug die Ist-Temperatur im Medium 31,8 °C in Minute 87 bzw. 30 °C in Minute 90. Dabei fanden sich keine Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen (Mann-Whitney-Test, $p = 0,1667$ in Minute 84, $p = 0,2619$ in Minute 87).

3.3 Auswirkungen einer Ca^{2+} -freien Lösung und Chelatierung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen auf die PTG

3.3.1 Auswirkungen auf die ziliäre Grundaktivität

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss der kombinierten Applikation von BAPTA/AM (10 μM , Minute 60) und EGTA (1 mM, Minute 25, $n = 3$) auf die ziliäre Aktivität im unstimulierten Zustand bei konstanter Temperatur von 30 °C untersucht.

Im Vergleich zu den Kontrollversuchen ($n = 3$) ohne Zugabe von BAPTA/AM fanden sich im Messintervall zwischen Minute 60 und 90 zu keinem Messzeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede (Two-Way-Anova-Test). Auch nach Stimulation mit ATP (10 μM , Minute 60) konnten keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollversuchen zu den entsprechenden Messzeitpunkten festgestellt werden (siehe Abbildung 15).

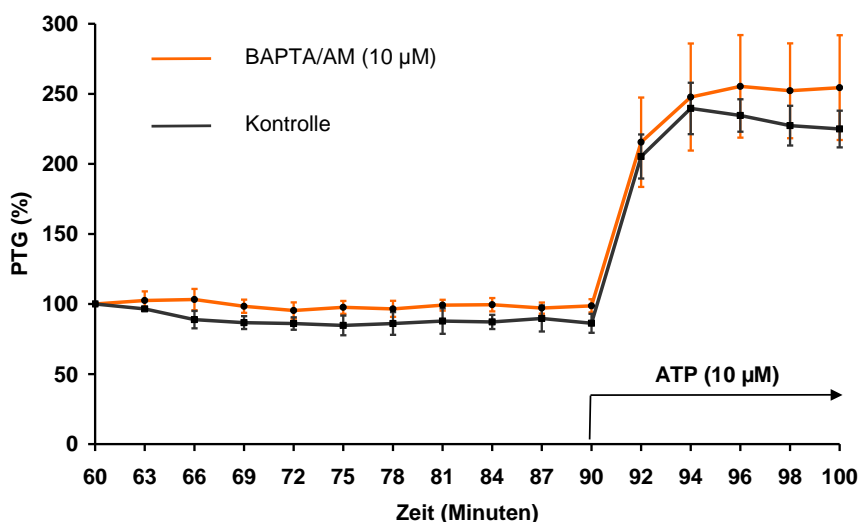


Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der PTG (bezogen auf Minute 60 als Referenz) bei konstanter Temperatur von 30 °C (Kontrollversuche $n = 3$) mit und ohne Applikation von BAPTA/AM (10 μM , Minute 60).

Dargestellt sind die PTG (MW 15%) und die zugehörigen SD. Die Zugabe von ATP (10 μM) erfolgte direkt im Anschluss an die Messung in Minute 90. Die Versuche wurden nach 100 Minuten beendet.

3.3.2 Auswirkungen auf die temperaturabhängigen Veränderungen der PTG

In dieser Versuchsreihe erfolgte zusätzlich zur Applikation von BAPTA/AM (10 μ M, Minute 60) und EGTA (1 mM, Minute 25) eine passagere einmalige (V_{1B-41} °C, $n = 3$) oder zweimalige (V_{2B-41} °C, $n = 3$) Veränderung der Soll-Temperatur auf 41 °C, um die Bedeutung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bei der temperaturabhängigen Regulation der ziliären Aktivität zu untersuchen. Als Kontrollversuche dienten Versuche mit entsprechender einmaliger oder zweimaliger passagerer Veränderung der Versuchstemperatur ohne Zugabe von BAPTA/AM ($n = 3$) bzw. Versuche mit konstanter Versuchstemperatur von 30 °C mit bzw. ohne Applikation von BAPTA/AM ($n = 3$, siehe Kapitel 2.7.2). Die Zugabe von ATP (10 μ M) resultierte in allen Versuchsreihen in der Messung erhöhter PTG. Bei den Versuchen fiel insgesamt eine Variabilität im Ausmaß der Steigerbarkeit der PTG durch die Applikation von ATP und die passagere Temperaturveränderung auf.

Die einmalige passagere Veränderung der Soll-Temperatur auf 41 °C erfolgte im Messintervall zwischen Minute 75 und 84. In Minute 78 betrug die PTG bei einer Ist-Temperatur von 35,7 °C im Medium $63,4 \pm 12,9$ μ m/s (129%). In den Messungen in Minute 81 und 84 ($73,4 \pm 18,6$ μ m/s, 148%) hielt sich die PTG im Anschluss auf einem Geschwindigkeitsplateau stabil. In Minute 81 wurde bei einer Ist-Temperatur von 40,7 °C die maximale PTG unter erhöhter Temperatur mit $75 \pm 22,3$ μ m/s (150%, Two-Way-Anova-Test $p < 0,05$) gemessen.

Auch bei den Kontrollversuchen erfolgte die passagere Veränderung der Versuchstemperatur von 30 °C auf 41 °C im Messintervall zwischen Minute 75 bis Minute 84. In Minute 78 betrug die PTG bei einer Ist-Temperatur von 35,7 °C $58,6 \pm 7,9$ μ m/s (132%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,05$). In den Messminuten 81 ($74,6 \pm 11,1$ μ m/s, 169,5%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,0001$) und 84 ($82,2 \pm 12,8$ μ m/s, 186%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,0001$) erreichte die PTG dann ebenfalls ein Geschwindigkeitsplateau.

Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich der Versuche mit einmaliger Veränderung der Soll-Temperatur auf 41 °C mit bzw. ohne Zugabe von BAPTA/AM konnten zu keinem Messzeitpunkt festgestellt werden (Two-Way-Anova-Test, siehe Abbildungen 16A und 16C).

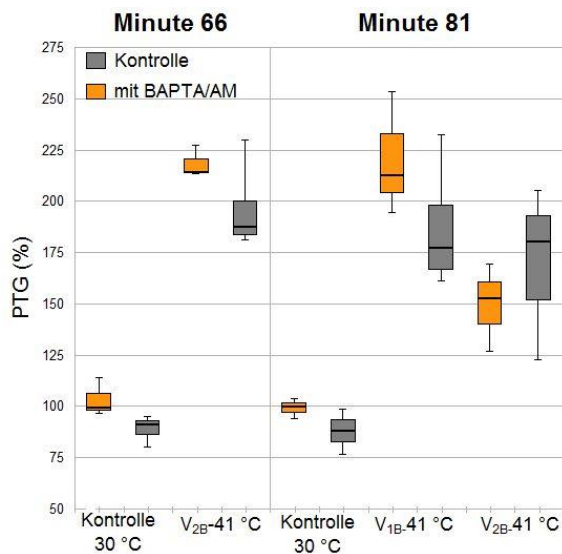
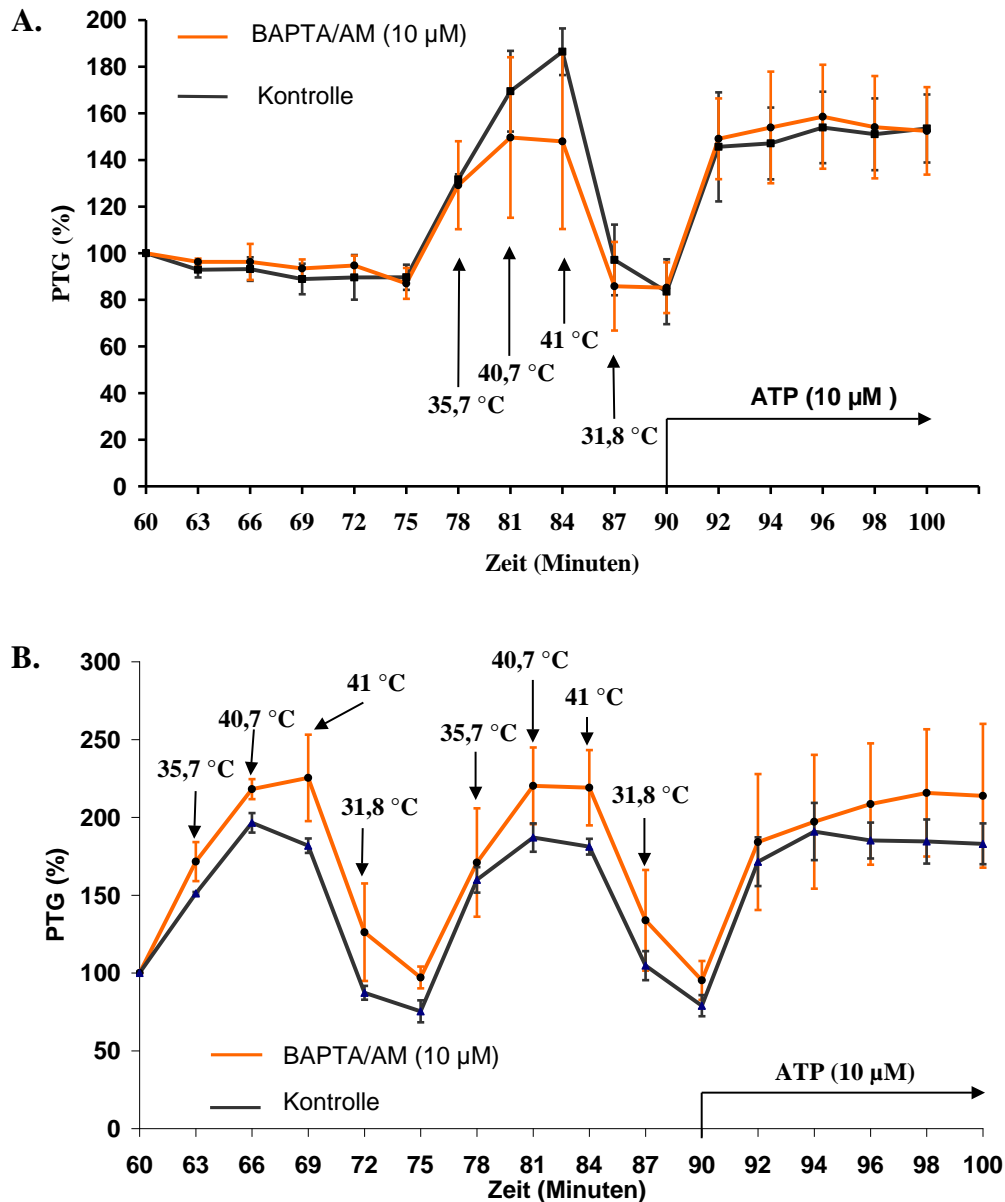


Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der PTG (bezogen auf Minute 60 als Referenz) mit bzw. ohne Applikation von BAPTA/AM (10 µM, Minute 60) und zusätzlicher einmaliger (A) bzw. zweimaliger (B) passagerer Erhöhung der Versuchstemperatur auf 41 °C.

Dargestellt sind die PTG (MW 15%) und die zugehörigen SD. Die Ist-Temperaturen innerhalb des Mediums zu den jeweiligen Messzeitpunkten sind in den Abbildungen durch Pfeile markiert. Die Zugabe von ATP (10 µM) erfolgte direkt im Anschluss an die Messung in Minute 90. Die Versuche wurden nach 100 Minuten beendet. C. zeigt eine vergleichende Darstellung der PTG zum Messzeitpunkt Minute 66 und 81 bei 30 °C bzw. 41 °C. Die Boxplots (C) zeigen den Median, die Minimum- und Maximumwerte sowie die Perzentilen 25 und 75. Unterschiede innerhalb der Vergleichsgruppe bestanden nicht.

Zweimalige passagere Temperaturveränderung von ursprünglich 30 °C auf 41 °C fanden im Messintervall zwischen Minute 60 bis 69 und im Anschluss an ein Intervall unter der initialen Soll-Temperatur von 30 °C (Minute 72 und 75) zwischen Minute 75 bis 84 statt. In Minute 63 betrug die Ist-Temperatur im Medium 35,7 °C; zeitgleich wurde die PTG mit $68,5 \pm 5,5 \mu\text{m/s}$ (172%) ermittelt. In den Messungen in Minute 66 und 69 zeigte sich die PTG dann plateauartig erhöht. In Minute 66 betrug die PTG $87 \pm 2,7 \mu\text{m/s}$ (218%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,0001$). Die insgesamt maximale PTG unter auf 41 °C erhöhter Soll-Temperatur wurde zum Messzeitpunkt in Minute 69 (Ist-Temperatur 40 °C) mit $89,7 \pm 9,2 \mu\text{m/s}$ (225%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,0001$) gemessen. Die erneute Änderung der Soll-Temperatur auf 41 °C erfolgte im Anschluss an ein Intervall unter der ursprünglichen Soll-Temperatur von 30 °C im Messintervall zwischen Minute 75 und 84. In Minute 78 betrug die PTG $67,9 \pm 12,7 \mu\text{m/s}$ (171%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,05$). Die maximale PTG unter der wiederholten Temperaturerhöhung auf 41 °C wurde in Minute 81 (Ist-Temperatur im Medium 40,7 °C) mit $87,7 \pm 8,7 \mu\text{m/s}$ (220%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,0001$) bestimmt. In der Folgemessung (Minute 84) betrug die PTG $87,3 \pm 8,7 \mu\text{m/s}$ (219%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,0001$).

Auch in den Kontrollversuchen wurde ein schneller Anstieg der PTG nach Umstellung der Soll-Temperatur auf 41 °C im Anschluss an die Messung in Minute 60 festgestellt. In Minute 63 betrug die PTG $71,8 \pm 10,5 \mu\text{m/s}$ (151%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,05$). Auch in den Messungen in Minute 66 ($94 \pm 19,1 \mu\text{m/s}$, 197%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,0001$) und 69 ($86,5 \pm 14,5 \mu\text{m/s}$, 182%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,0001$) blieb die PTG plateauartig erhöht. Im Anschluss an ein Messintervall unter der ursprünglichen Soll-Temperatur von 30 °C in den Messungen in Minute 72 und 75 wurde die Soll-Temperatur für die Messungen in Minute 75 bis 84 erneut auf 41 °C erhöht. In Minute 78 wurde die PTG bei einer Ist-Temperatur im Medium von 35,7 °C mit $75,3 \pm 7,5 \mu\text{m/s}$ (160%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,001$) bestimmt. Die maximale PTG während des zweiten Beobachtungsintervalls mit erhöhter Versuchstemperatur betrug $89,4 \pm 21,1 \mu\text{m/s}$ (187%) zum Messzeitpunkt Minute 81 (Ist-Temperatur 40,7 °C, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,0001$). In der Folgebestimmung (Minute 84) wurde die PTG mit $86,9 \pm 22,9 \mu\text{m/s}$ (181%, Two-Way-Anova-Test, $p < 0,0001$) gemessen.

Im Vergleich der Versuche mit und ohne Zugabe von BAPTA/AM (10 μM , Minute 60) ergaben sich zu keinem Messzeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der PTG (Two-Way-Anova Test, siehe Abbildungen 16B und 16C).

4 Diskussion

4.1 Methode zur Messung der ziliären Transportleistung

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen passagerer Temperaturveränderungen auf die ziliäre Aktivität im Hinblick auf die PTG und KSF sowie die Bedeutung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bei der Vermittlung temperaturabhängiger Veränderungen der ziliären Aktivität und der Regulation der ziliären Grundaktivität zu untersuchen.

Eine Anforderung an das Versuchssystem war es, Versuchsbedingungen zu schaffen, die denen *in vivo* weitestgehend ähneln. Der Großteil der Forschungsergebnisse zur mukoziliären Clearance basiert bis dato auf *In-vitro*-Untersuchungen an Gewebekulturen, die nicht den physiologischen Verhältnissen *in vivo* entsprechen. Die verschiedenen *In-vitro*-Verfahren zur Kultivierung respiratorischer Epithelien sind meist mit spezifischen Veränderungen des Epithels verbunden. In Zellsuspension- und Monolayerkulturen verlieren die Zellen ihre *in vivo* vorhandene Differenzierung, da sie aus ihrem physiologischen Verband (siehe Kapitel 1.1), bestehend aus Basalmembran, Becherzellen und Kinozilien-tragendem Epithel, gelöst werden, was Auswirkungen auf die Funktionsweise der Zellen hat (Rautiainen et al. 1993, de Jong et al. 1994, Jorissen et al. 1995 & 1999). Darüber hinaus bleiben die komplexen räumlich-zeitlichen Aspekte, die für einen koordinierten Transport innerhalb der Trachea nötig sind, unbeachtet (Ma et al. 2002). Die Messungen in den hier vorliegenden Versuchen wurden an frisch entnommenen Tracheen von Mäusen durchgeführt, wobei die physiologischen Zellverbindungen und die Kinozilien-tragenden Zellen selbst intakt blieben. Im Gegensatz zu Messungen an Zellkulturen ähneln die Bedingungen bei dieser Vorgehensweise daher weitestgehend denen *in vivo*.

Kinozilien-tragende und Mukus-produzierende Zellen sind funktionell eng miteinander verknüpft, sodass es bei den meisten bisher eingesetzten Messmethoden nicht möglich war, die ziliäre Transportfunktion getrennt von der ihr aufliegenden Mukusschicht zu untersuchen (Hilding 1931, Tremble et al. 1948, Harper et al. 1962, Proctor et al. 1965, Andersen et al. 1971, Connolly et al. 1978, Velasquez et al. 1984, Foster et al. 2001). Für eine genauere Quantifizierung der Temperaturabhängigkeit der ziliären Transportleistung wurde ein Messsystem verwendet, das es ermöglichte, temperaturabhängige Veränderungen des Trachealsekrets, die Auswirkungen auf die rheologischen Eigenschaften des Mukus und damit auf die mukoziliäre Clearance haben, bei der

Messung unberücksichtigt zu lassen. Die entnommenen Tracheen wurden dafür nach der Präparation sowie unmittelbar vor Beginn der Messungen mehrfach vorsichtig in HEPES-Ringer-Pufferlösung gewaschen, sodass sie vollständig von bedeckendem Mukus befreit wurden. HEPES-Ringer-Pufferlösung diente darüber hinaus als Medium während der Versuche, sodass sich auch während der Versuche selbst keine kontinuierliche Sekretschicht aufbauen konnte.

Das verwendete Messsystem ermöglichte es, das Gesamtergebnis der ziliären Transportfunktion (PTG) sowie die KSF zu quantifizieren. Die Aufzeichnung des Kinozilienschlags erfolgte mittels eines videomikroskopischen Systems. Aufgrund der hohen Bildfrequenz handelt es sich dabei um eine sehr verlässliche Methode zur Analyse des Kinozilienschlags (Trindade et al. 2007). Die Bestimmung der KSF erfolgte mittels Fast Fourier Transformation, durch die die KSF sehr präzise bestimmt werden kann.

Viele Untersuchungen der ziliären Funktion beschränken sich auf die Messung der KSF und vernachlässigen den wichtigen Parameter der Koordination zwischen Kinozilientragenden Zellen (Lee et al. 2005). Neben der Bestimmung der KSF als direktem Parameter der ziliären Funktion wurden daher, um die komplexen räumlich-zeitlichen Aspekte des koordinierten Kinozilienschlags zu berücksichtigen, die PTG von Dynabeads bestimmt, die durch Kinozilienschlag in der Trachea transportiert wurden. Im Vergleich zur Messung der KSF einzelner Kinozilientragender Zellen kann so die ziliäre Transportleistung über größere Areale Kinozilientragender Zellen gemessen werden. Die Messung der Transportgeschwindigkeit von Dynabeads liefert außerdem Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Veränderungen der KSF und dem resultierenden effektiven Stofftransport in der Trachea und hilft so die physiologische Relevanz einer Veränderung der KSF für die mukoziliäre Clearance abzuschätzen. Aufgrund der individuellen Geschwindigkeitsberechnung von bis zu 300 Partikeln pro Messzeitpunkt konnte eine deutlich größere Datenmenge in die Ergebnisse mit einbezogen werden als dies bei früheren Untersuchungsmethoden möglich gewesen war (Burn et al. 1954, Klein et al. 2009).

Ein weiterer Vorteil der hier verwendeten Methode lag in der Möglichkeit zur präzisen Regulation der Versuchstemperatur, die zu jedem Messzeitpunkt mit Hilfe einer externen Temperaturelektrode überprüft werden konnte. Im Trachealepithel der Maus liegt die Temperatur bei konstanten 30 °C (Zhang et al. 2004). Um physiologische Verhältnisse zu imitieren, wurde bei allen Versuchen daher eine Ursprungstemperatur von 30 °C gewählt.

Die Applikation von ATP (10 μ M) diente dem Nachweis einer Stimulierbarkeit der ziliären Aktivität in dem verwendeten Messsystem und der Vitalität der untersuchten Tracheen 90 Minuten nach Versuchsbeginn. Die Zugabe von ATP bewirkte in allen Versuchsreihen einen Anstieg der PTG bzw. KSF. Vergleichbar mit unterschiedlichen Anfangsgeschwindigkeiten der KSF bzw. PTG zu Messbeginn (siehe Kapitel 2.9), zeigte sich auch im Ausmaß der Einflussnahme von ATP auf die PTG bzw. KSF eine Variabilität zwischen den einzelnen Versuchen. Zudem fiel eine zunehmende Streuung der Messwerte für die PTG bzw. KSF bei Erhöhung der Versuchstemperatur auf höhere Soll-Temperaturen auf. Zahlreiche Autoren berichten in diesem Zusammenhang von ähnlichen Beobachtungen. U. a. Ma et al. (2002), Zhang et al. (2003a) und Evans et al. (1999) beschreiben in ihren Versuchen interindividuelle Unterschiede in der ziliären Grundaktivität bzw. im Ausmaß der Steigerbarkeit der ziliären Aktivität durch unterschiedliche Stimulantien, deren Ursache sie letztendlich nicht zuordnen konnten. Möglicherweise spielen dabei auch physiologische Einflussfaktoren auf die mukoziliäre Clearance eine Rolle (siehe Kapitel 1.2.5). Für die hier vorliegenden Versuche wurden daher einheitlich männliche Mäuse der Zuchtlinie Black 6-N C57 mit einem Alter zwischen 13-15 Wochen verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ferner untersucht, welche Bedeutung intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen bei der Aufrechterhaltung der ziliären Grundaktivität und der Vermittlung der beobachteten temperaturabhängigen Veränderungen der PTG spielen. Die Quelle für die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind zum einen Ca^{2+} -Ionen, die aus den intrazellulären Calciumspeichern freigesetzt werden, oder zum anderen Ca^{2+} -Ionen, die z. B. nach Aktivierung der PLC-IP3-Signalkaskade durch extrazelluläre Rezeptoragonisten aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol einströmen (siehe Kapitel 1.3.4). Um einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen vom Extra- in den Intrazellulärraum zu verhindern, wurden die entsprechenden Versuche in Ca^{2+} -freier HEPES-Ringer-Pufferlösung als Medium durchgeführt. Durch die Zugabe von EGTA (1 mM, Minute 25), einem nicht membrangängigen Chelator für Ca^{2+} -Ionen, wurden möglicherweise extrazellulär verbliebene Spuren von Ca^{2+} -Ionen zusätzlich gebunden (siehe Kapitel 2.5). Um die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu minimieren, erfolgte ferner die Applikation von BAPTA/AM (10 μ M, Minute 60), einem membrangängigen Chelator für intrazellulären Ca^{2+} -Ionen (siehe Kapitel 4.3).

4.2 Temperaturabhängigkeit der ziliären Transportleistung

Dass Temperaturveränderungen eine Auswirkung auf die ziliäre Aktivität besitzen, ist in der Literatur beschrieben. Bei dem Großteil der experimentellen Arbeiten, die diesbezüglich durchgeführt wurden, handelt es sich jedoch um In-vitro-Messungen an Zellkulturen v. a. aus dem Trachealepithel von Hasen, Meerschweinchen und dem menschlichen Respirationstrakt (Eshel et al. 1986). Untersucht wurden in der Vergangenheit dabei v. a. die direkte Abhängigkeit der Kinozilienfunktion von steigenden Temperaturen sowie der schädigende Einfluss hoher bzw. niedriger Temperaturen auf die KSF (siehe Kapitel 1.3.6). Die hier verwendete Messmethode ermöglichte es erstmalig, ex vivo den isolierten Einfluss passagerer Temperaturveränderungen auf die ziliäre Aktivität durch Bestimmung der KSF und der PTG zu quantifizieren (siehe Kapitel 4.1).

In den hier vorliegenden Versuchen zur Temperaturabhängigkeit der KSF konnte gezeigt werden, dass eine passagere Anhebung der Versuchstemperatur auf 41 °C zu einer signifikanten Erhöhung der KSF führt und dass umgekehrt eine vorübergehende Erniedrigung der Temperatur auf 22 °C mit einer signifikanten Reduktion der KSF einhergeht. Während des Beobachtungsintervalls mit veränderter Versuchstemperatur blieb die KSF nach Erreichen der am Thermostaten festgesetzten Soll-Temperatur innerhalb des Mediums bis zur erneuten Umstellung der Soll-Temperatur plateauartig erhöht bzw. erniedrigt. Die hier vorliegenden Ergebnisse decken sich damit mit früheren Forschungsergebnissen und bestätigen den in der Literatur einheitlich beschriebenen Zusammenhang zwischen Temperatur und der KSF (Calliburces et al. 1858, Proetz 1934, Irvani 1967, Mercke et al. 1974, Eshel et al. 1986, Kennedy et al. 1986, Sleight et al. 1988, Clary-Meinesz et al. 1992, O'Callaghan et al. 1995, Kilgour et al. 2004, Smith et al. 2011, Humphries et al. 2013, siehe Kapitel 1.3.6). Ferner fand sich ein Einfluss einer passageren Temperaturveränderung auf die Transportgeschwindigkeit von Dynabeads im Kinozilien-tragenden Epithel der Trachea von Mäusen. Vergleichbar mit den Beobachtungen zum Einfluss passagerer Temperaturveränderungen auf die KSF resultierten passagere Erhöhungen der Versuchstemperatur in der Messung signifikant erhöhter PTG, wohingegen vorübergehende Reduktionen der Versuchstemperatur mit der Messung signifikant reduzierter PTG einhergingen. Die temperaturabhängige Veränderung der PTG zeigte sich dabei erneut über das gesamte Intervall mit veränderter Temperatur plateauartig erhöht bzw. erniedrigt. Untersucht wurde der Einfluss einer

passageren Veränderung der Versuchstemperatur von 30 °C auf 22 °C, 26 °C, 34 °C, 37 °C und auf die pathophysiologische Temperatur von 41 °C. Die passagere Reduktion der Versuchstemperatur auf 22 °C führte dabei zu einem funktionellen Stillstand der PTG, wohingegen die vorübergehende Absenkung der Versuchstemperatur auf 26 °C in einem messbaren Rückgang der PTG resultierte. Das Ausmaß der Steigerbarkeit der PTG durch eine passagere Temperaturerhöhung im beobachteten Messintervall zeigte sich insgesamt tendenziell von der Temperaturdifferenz abhängig. Während passagere Temperaturerhöhungen auf 34 °C bereits in der Messung signifikant erhöhter PTG resultierten, wurden die maximalen PTG unter erhöhter Versuchstemperatur bei einer passageren Veränderung der Soll-Temperatur auf 41 °C erreicht. Statistisch signifikante Unterschiede der PTG zwischen den unterschiedlichen Soll-Temperaturen fanden sich jedoch nicht. Dies scheint, zumindest teilweise, auf eine physiologische Variabilität in der Stimulierbarkeit der ziliären Aktivität der unterschiedlichen Tracheen zurück zu führen sein, was sich auch an der zunehmenden Streuung der Messwerte nach Stimulation durch die passagere Temperaturveränderung zeigte. Entsprechende Beobachtungen waren auch nach Stimulation mit ATP aufgefallen; dabei hatte sich ebenfalls eine Variabilität im Ausmaß der Steigerbarkeit der PTG nach Stimulation mit ATP gezeigt (siehe Kapitel 4.1).

Die Mehrzahl der publizierten Forschungsergebnisse beschreibt einen sigmoidalen Zusammenhang zwischen der Temperatur und der ziliären Aktivität (Smith et al. 2011). Im optimalen Temperaturbereich wird dabei von einem linearen Zusammenhang berichtet. Dem Vorliegen eines sigmoidalen Zusammenhangs zwischen Temperatur und KSF widersprechen in der Literatur lediglich Forschungsergebnisse von Esehl et al. (1986), die einen exponentiellen Einfluss der Temperatur auf die KSF feststellten. Im Gegensatz zu anderen Forschergruppen führten sie ihre Untersuchungen allerdings am Gaumenepithel von Fröschen durch. In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf das Vorliegen eines möglicherweise andersartig gestalteten Regulationsmechanismus der KSF bei Amphibien, speziell Fröschen, im Vergleich zu Säugetieren. Die Angaben zum Q_{10} -Wert schwanken in der Literatur stark. In Abhängigkeit der untersuchten Spezies, der Lokalisation des Kinozilien-tragenden Epithels innerhalb der Atemwegen und des untersuchten Temperaturbereichs werden dabei Werte zwischen 1 (O’Callaghan et al. 1995) und 4 (Irvani et al. 1967) angegeben. In den hier vorliegenden Messungen wurde der Q_{10} -Wert mit 2,76 berechnet. In dem untersuchten Temperaturintervall besteht ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen Temperatur und ziliärer Transportleistung.

Mit Hilfe des hier verwendeten Messsystems konnte ferner gezeigt werden, dass der Einfluss einer Temperaturveränderung auf die ziliäre Funktion reversibel ist. Nach Erreichen der am Thermostaten eingestellten Soll-Temperatur im Medium blieb die PTG bzw. KSF während des gesamten Beobachtungsintervalls mit veränderter Soll-Temperatur bis zur erneuten Temperaturumstellung plateauartig erhöht bzw. erniedrigt. Nach Wiedereinstellen der initialen Versuchstemperatur von 30 °C am Thermostaten wurden in allen Versuchen (V-22 °C, V-26 °C, V-34 °C, V-37 °C, V₁-41 °C und V₂-41 °C) in der Folgemessung PTG bzw. KSF gemessen, die dem Geschwindigkeits- bzw. Frequenzniveau des Ausgangswertes (Minute 60) vor Veränderung der Versuchstemperatur entsprachen. Nach Wiedererreichen der ursprünglichen Temperatur von 30 °C im Medium bestanden keine Unterschiede bezüglich der PTG bzw. KSF im Vergleich zu den Kontrollversuchen zu den entsprechenden Messzeitpunkten.

Ferner konnte gezeigt werden, dass sich der Effekt von Temperatur auf die PTG wiederholen lässt. Eine zweite passagere Temperaturerhöhung (V₂-41 °C) im Anschluss an ein Messintervall unter der Ausgangstemperatur von 30 °C resultierte erneut in der Messung signifikant erhöhter PTG. Das Ausmaß der Veränderung der PTG während der ersten und zweiten Temperaturveränderung unterschied sich dabei nicht. Aufgrund dieser Beobachtung ist davon auszugehen, dass es im Rahmen wiederholter Veränderungen der Temperatur nicht zu einer Toleranzentwicklung oder Sensibilisierung der ziliären Aktivität an Temperaturveränderungen kommt.

4.3 Der Einfluss einer Ca²⁺-freien Lösung und Chelatierung intrazellulärer Ca²⁺-Ionen auf die ziliäre Grundaktivität

Es existieren zwei Zustandsformen der ziliären Aktivität. Im Gegensatz zum Zustand gesteigerter ziliärer Aktivität sind die intrazellulären Mechanismen, die für die Aufrechterhaltung der ziliären Grundaktivität verantwortlich sind, nur unzureichend erforscht. In den hier vorliegenden Ergebnissen blieb die Applikation von BAPTA/AM und EGTA in eine Ca²⁺-freie HEPES-Ringer-Pufferlösung ohne Auswirkung auf die ziliäre Aktivität im unstimulierten Zustand und bei konstanter Temperatur von 30 °C. Diese Beobachtung bestätigt frühere Forschungsergebnisse, die eine Unabhängigkeit der ziliären Grundaktivität von intrazellulären Ca²⁺-Ionen vermuten lassen (Kakuta et al. 1985, Lansley et al. 1992, Wanner et al. 1996, Braiman et al. 2008). Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik beispielsweise konnten Ma et al. (2002) zeigen, dass isolierte

Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ oder kombinierte Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ und CaM-Konzentration ohne Einfluss auf die ziliäre Grundaktivität bleiben. Selbst in Ca^{2+} -freiem Milieu blieb die ziliäre Grundaktivität in ihren Versuchen unverändert.

Nachdem die Auswirkung der kombinierten Applikation von BAPTA/AM und EGTA auf die ziliäre Grundaktivität im unstimulierten Zustand und bei konstanter Temperatur von 30 °C beobachtet wurde, erfolgte im Anschluss ein Stimulationsversuch mit ATP. Überraschenderweise zeigte sich in den hier vorliegenden Versuchen trotz der kombinierten Applikation von EGTA und BAPTA/AM ein unveränderter Anstieg der PTG im Anschluss an eine Stimulation purinerger Rezeptoren mittels ATP (10 μ M). Der Effekt auf die ziliäre Funktion nach purinerger Stimulation der Kinozilien-tragenden Zellen wird bei Säugetieren auf intrazellulärer Ebene durch das komplexe Zusammenspiel verschiedener Signalkaskaden vermittelt. Neben intrazellulären Ca^{2+} -Ionen spielen dabei auch andere Signalkaskaden, die v. a. cGMP und cAMP involvieren (siehe Kapitel 1.3), eine entscheidende Rolle. Morse et al. (2001) beispielsweise konnten zeigen, dass Adenosin, ein extrazelluläres Hydrolyseprodukt von ATP, über die Stimulation des G-Protein gekoppelten Adenosin-A2b-Rezeptors und die nachfolgende Aktivierung von AC und der cAMP-PKA-Signalkaskade zur Steuerung der ziliären Aktivität befähigt ist. Zhang et al. (2003a) konnten zusätzlich nachweisen, dass die Hydrolyseprodukte von ATP (Adenosindiphosphat, Adenosinmonophosphat und Adenosin) die ziliäre Aktivität Ca^{2+} -unabhängig regulieren können. Welche Rolle die Hydrolyseprodukte von ATP bei der Regulation der ziliären Aktivität in vivo jedoch tatsächlich spielen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Nach Applikation von BAPTA/AM (20 μ M) beobachteten Zhang et al. (2003a) keinen Anstieg der ziliären Aktivität trotz Zugabe von ATP. Sie kamen daher zu dem Schluss, dass die Hydrolyse von ATP in ihren Versuchen nur eine untergeordnete Rolle bei der Regulation der KSF spielt. Allerdings führten sie ihre In-vitro-Versuche über einen sehr kurzen Beobachtungszeitraum von nur 3 Minuten durch. In den hier vorliegenden Versuchen erfolgte hingegen eine Beobachtung über einen Zeitraum von 10 Minuten, wobei die erste Messung der PTG erst 2 Minuten nach Applikation von ATP erfolgte. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse von ATP ist ferner abhängig von der Konzentration an Nukleotidasen (Picher et al. 2001), deren Konzentration in den Experimenten von Zhang et al. (2003) als auch in den hier vorliegenden Versuchen nicht bestimmt wurde. In Anbetracht der unterschiedlichen Methodik sowie des längeren Beobachtungsintervalls nach erfolgter ATP-Stimulation (10 Minuten) ist eine Aktivierung der ziliären Aktivität

über ATP-Hydrolyseprodukte bzw. cAMP- abhängige Signalkaskaden in den hier durchgeführten Versuchen vorstellbar. Auch ein zusätzlicher Einfluss cGMP-abhängiger Kontrollmechanismen ist denkbar.

4.4 Der Einfluss einer Ca^{2+} -freien Lösung und Chelatierung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen auf die Temperaturabhängigkeit der PTG

Während der Zusammenhang zwischen der Temperatur und der ziliären Funktion bereits in verschiedenen Publikationen untersucht wurde, sind die zellulären Mechanismen, die der Regulation der ziliären Aktivität durch Veränderungen der Temperatur zugrunde liegen, nach wie vor unbekannt. Frühere Studien haben gezeigt, dass intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zustandes gesteigerter ziliärer Aktivität spielen (Naito et al. 1972, Girad et al. 1986, Sanderson et al. 1989, Villalon et al. 1989, Di Benedetto et al. 1991, Salathe et al. 1995 & 1999, Korngreen et al. 1994 & 1996, Lansley et al. 1999, Uzlaner et al. 1999, Braiman et al. 2001, Zagoory et al. 2002, siehe Kapitel 1.3.4). Um die Bedeutung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bei der Vermittlung des temperaturabhängigen Einflusses auf die PTG zu untersuchen, wurden Versuche in Ca^{2+} -freier HEPES-Ringer-Pufferlösung mit zusätzlicher Applikation von EGTA und BAPTA/AM durchgeführt, bei denen eine zusätzliche einmalige oder zweimalige passagere Veränderung der Versuchstemperatur auf 41 °C erfolgte.

Bei BAPTA/AM handelt es sich um einen Chelator für intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen. BAPTA/AM kann die Zellmembran frei passieren, dringt jedoch nicht in die intrazellulären Calciumspeicher ein. Erst nach Freisetzung aus den intrazellulären Speichern werden die intrazellulären Ca^{2+} -Ionen unmittelbar von BAPTA/AM chelatiert. BAPTA/AM wurde in einer Konzentration von 10 μM in das T-Dish pipettiert. Entsprechend seines Konzentrationsgradienten verteilte sich BAPTA/AM dann homogen im Zytosol. Im Rahmen der hier verwendeten Methodik erfolgte keine zusätzliche Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher und keine Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sodass die tatsächliche $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Zytosol nach Applikation von BAPTA/AM unbekannt blieb. Ferner waren in den hier vorliegenden Versuchen auch die Kinetik der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus den intrazellulären Calciumspeichern, die Kinetik in der Chelatierung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen durch BAPTA/AM nach deren Freisetzung aus den

intrazellulären Calciumspeichern und die Verteilung der intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bzw. von BAPTA/AM im Medium nicht bekannt. Nach Stimulation Kinozilien-tragender Zellen wird in der Literatur mehrheitlich von einer raschen Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus den intrazellulären Calciumspeichern in das Zytosol berichtet (Wanner et al. 1996, Braiman et al. 2000a & 2001, Schmid et al. 2011). Die Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen ist dabei nicht gleichmäßig auf das gesamte Zytosol verteilt, sondern v. a. auf die apikalen Zellmembran nahen Anteile beschränkt (siehe Kapitel 1.3.4). Durch die lokale Freisetzung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen im Bereich der Basis der Kinozilien wird eine potentielle Schädigung der Kinozilien-tragenden Zellen durch die steigende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unterbunden (Rasmussen et al. 1990, Braiman et al. 2000a). Dabei ist bereits eine geringe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausreichend, um eine anhaltende Steigerung der ziliären Aktivität zu bewirken (Sanderson et al. 1990, Di Benedetto et al. 1991, Korngreen et al. 1994 & 1996, Lieb et al. 2002). Aufgrund der Verwendung von BAPTA/AM in hoher Konzentration ist jedoch trotz fehlender Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher und Messung der tatsächlichen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ davon auszugehen, dass nach dessen Applikation intrazellulär keine Ca^{2+} -Ionen verbleiben.

In den hier vorliegenden Ergebnissen zeigte sich insgesamt kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Versuchen mit bzw. ohne Applikation von BAPTA/AM. Die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen dagegen die vorausgegangene Beobachtung des reversiblen und wiederholbaren Einflusses einer passageren Veränderung der Versuchstemperatur auf die ziliäre Aktivität (siehe Kapitel 4.2) trotz der kombinierten Applikation von BAPTA/AM und EGTA. Nach Erreichen der am Thermostat eingestellten erhöhten Soll-Temperatur im Medium zeigte sich die PTG erneut plateauartig erhöht. Der Einfluss der Temperaturerhöhung auf die PTG war nach Beendigung der Temperaturveränderung erneut reversibel und durch eine zweite passagere Anhebung der Versuchstemperatur wiederholbar (siehe Kapitel 4.2).

Die Beobachtung der fehlenden Einflussnahme einer Chelatierung intra- und extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen durch die kombinierte Applikation von BAPTA/AM und EGTA liefert damit Hinweise auf eine mögliche Unabhängigkeit in der Vermittlung temperaturinduzierter Veränderungen der ziliären Aktivität von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungsergebnisse von Lansley et al. (1999) interessant, die bei gleichzeitiger Messung der KSF und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Auswirkung einer mechanischen Stimulation auf die Aktivität Kinozilien-tragender Zellen bei Raumtemperatur (20–23 °C) bzw. bei 37 °C untersuchten. Zwar wurde ein

unterschiedlicher Versuchsaufbau verwendet, ihre Forschungsergebnisse weisen jedoch in eine ähnliche Richtung. In ihren Versuchen zeigte sich die basale $[Ca^{2+}]_i$ zwar temperaturabhängig, die mechanische Stimulation bewirkte in beiden Versuchsgruppen trotz des Temperaturunterschieds jedoch einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auf eine vergleichbare durchschnittliche Maximalkonzentration, wobei die maximale KSF bei den Versuchen bei 37 °C deutlich über der maximalen KSF der Versuche bei Raumtemperatur lag. In ihren Versuchen wurde der Zustand gesteigerter ziliärer Aktivität also unabhängig von der $[Ca^{2+}]_i$ und der Temperatur reguliert.

Für die beobachtete Auswirkung einer Veränderung der Temperatur auf die ziliäre Aktivität könnte dabei eine direkte Beeinflussung axonaler Strukturen unabhängig von intrazellulären Signalkaskaden eine Rolle spielen. Diesbezügliche Publikationen fanden sich zum Zeitpunkt der Recherche für diese Arbeit jedoch nicht. Interessant in diesem Zusammenhang sind allerdings Forschungsergebnisse zum Einfluss des pH_i auf die ziliäre Aktivität. Diese lassen vermuten, dass pH_i -abhängige Veränderungen der KSF, unabhängig von weiteren Signalkaskaden, über eine direkte Einflussnahme auf axonale Strukturen vermittelt werden. Die Applikation von unterschiedlichen Phosphatase- und Kinase-Inhibitoren, die Blockade der PKA, aber auch eine Modulation der $[Ca^{2+}]_i$ zeigten sich ohne Auswirkung auf pH_i -bedingte Veränderungen der KSF (Sutto et al. 2004). Mit der pH_i -abhängigen Regulation der KSF werden v. a. die äußeren Dyneinarme, denen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der ziliären Aktivität zugeschrieben wird, in Verbindung gebracht (Keskes et al. 1998). Auch für den Effekt von Temperatur auf die ziliäre Aktivität könnte entsprechend eine direkte temperaturabhängige Einflussnahme auf axonale Strukturen verantwortlich sein. Entsprechende diesbezügliche Untersuchungen bleiben jedoch abzuwarten um diesen Sachverhalt zu klären.

Neben einem möglichen direkten Einfluss der Temperatur auf integrale Bestandteile des ziliären Axonems könnten in Anbetracht der Verflechtung der verschiedenen Signalkaskaden zur Steuerung ziliärer Aktivität auch andere intrazelluläre Signalkaskaden bei temperaturbedingten Veränderungen der ziliären Aktivität eine Rolle spielen (Zagoory et al. 2002, Braiman et al. 2008, Schmid et al. 2011, siehe Kapitel 1.3.5). In diesem Zusammenhang sind Forschungsergebnisse von Zagoory et al. (2002), Ma et al. (2002) und Braiman et al. (2000a) interessant, die in ihren Versuchen Hinweise auf alternative Regulationsmechanismen der ziliären Funktion durch die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP fanden (siehe Kapitel 4.2.2). Publikationen, die sich mit der Beteiligung cAMP- und cGMP-abhängiger Signalkaskaden bei der Vermittlung des

Effekts von Temperatur auf die ziliäre Aktivität beschäftigen, finden sich in der Literatur bis dato jedoch nicht.

Bei der Vermittlung des Effekts von Temperaturveränderungen auf die PTG sind temperaturabhängige Veränderungen der Reaktionsgeschwindigkeit beteiligter Enzyme zu berücksichtigen. Entsprechend der Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel führen Temperaturveränderungen zu einer Veränderung der kinetischen Energie der Teilchen. Die Teilchenkinetik hat einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen, die Membranfluidität sowie das Diffusions- und Osmoseverhalten. Eine Zunahme der Temperatur führt zu einer Beschleunigung (bio-) chemischer Reaktionen sowie zu einem schnelleren intrazellulären Stofftransport (Lansley et al. 1999, Mwimbi et al. 2003). Die ziliäre Grundaktivität wird, im Gegensatz zum Zustand gesteigerter ziliärer Aktivität, vermutlich nur von spontaner Dynein-ATPase-Aktivität getragen und ist nicht an intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen bzw. intrazelluläre Signalkaskaden gebunden. Die Temperaturabhängigkeit der Aktivität beteiligter Enzyme führt neben einer vermehrten Bereitstellung von Energieträgern durch den schnelleren Transport von ATP zu den axonalen Motorproteinen zu einer Erhöhung dieser spontanen Dynein-ATPase-Aktivität und in der Folge zu einer Zunahme der KSF und der PTG.

4.5 Schlussfolgerung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer passageren Veränderung der Versuchstemperatur auf die ziliäre Aktivität im Kinozilien-tragenden Trachealepithel von Mäusen und die dabei zugrundeliegenden zellulären Mechanismen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass passagere Veränderungen der Temperatur mit einer entsprechenden Zu- oder Abnahme der ziliären Aktivität bei Messung der KSF bzw. PTG einhergehen. Die Chelatierung extra- und intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen durch die kombinierte Applikation von BAPTA/AM und EGTA zeigte sich außerdem im Vergleich mit entsprechenden Kontrollversuchen ohne statistisch signifikante Auswirkung auf die ziliäre Grundaktivität. Dies stimmt mit früheren Forschungsergebnissen überein, denen zu Folge die ziliäre Grundaktivität unabhängig von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen reguliert wird. Auch die abschließende Stimulation mit ATP führte trotz Zugabe von BAPTA/AM und EGTA in eine Ca^{2+} -freie HEPES-Ringer-Pufferlösung zu einem unveränderten Anstieg der PTG. Der stimulierende Effekt von ATP auf die ziliäre Aktivität könnte dabei durch extrazelluläre Hydrolyseprodukte von ATP und die nachfolgende Aktivierung z. B. der

cAMP-PKA-Signalkaskade zurückzuführen sein. Klarheit diesbezüglich könnten Versuche mit Verwendung von nicht-hydrolysierbarem ATP schaffen.

Die Verwendung einer Ca^{2+} -freien HEPES-Ringer-Pufferlösung mit zusätzlicher Applikation von BAPTA/AM und EGTA hatte ferner keine Auswirkung auf den beobachteten Einfluss einer passageren Temperaturveränderung auf die PTG. Damit finden sich Hinweise auf eine mögliche Unabhängigkeit in der Vermittlung temperaturabhängiger Veränderung der ziliären Aktivität von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen. Für die beobachtete Auswirkung der passageren Temperaturveränderung auf die PTG trotz Zugabe von BAPTA/AM und EGTA könnte eine direkte Einflussnahme der Temperatur auf integrale Bestandteile des ziliären Axonems verantwortlich sein. Ferner ist eine zusätzliche Beteiligung alternativer Signalkaskaden bei der Vermittlung temperaturabhängiger Veränderungen der PTG bzw. bei der Regulation der ziliären Grundaktivität denkbar. Die dabei möglicherweise involvierten zellulären Prozesse und Signalkaskaden wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht weiterführend untersucht, sodass die verantwortlichen zellulären Kontrollmechanismen nicht abschließend geklärt werden konnten. Um die Beteiligung der verschiedenen zellulären Signalkaskaden weitergehend zu untersuchen, könnten Versuche mit zusätzlicher Applikation von beispielsweise Koffein, zur Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher, oder Versuche mit Zugabe von BAPTA/AM und zusätzlicher Applikation von Inhibitoren der cAMP-PKA- oder cGMP-PKG-Signalkaskade wegweisend sein.

5 Zusammenfassung

Die mukoziliäre Clearance dient u. a. dem Schutz der Atemwege vor inhalierten Fremdstoffen. Die KSF wird dabei als wichtigste Determinante der mukoziliären Reinigung angesehen. Sie unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren und kann an sich verändernde Umweltbedingungen angepasst werden. Neben einem Grundzustand, in dem die Kinozilien mit geringerer Frequenz schlagen, existiert daher ein Zustand gesteigerter KSF. Die molekularen Mechanismen, die bei der Regulation der beiden Zustandsformen der ziliären Aktivität eine Rolle spielen, sind komplex und werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen scheinen dabei jedoch spezieübergreifend eine zentrale Rolle einzunehmen. Während der Effekt extrazellulärer Rezeptoragonisten, wie z. B. ATP, auf die ziliäre Aktivität umfassend erforscht ist, sind die ziliäre Grundaktivität und der Einfluss der Temperatur auf die ziliäre Aktivität und die dabei zugrunde liegenden zellulären Mechanismen weitestgehend unerforscht.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die ziliäre Aktivität ex vivo untersucht. Das verwendete Messsystem ermöglichte es, die ziliäre Aktivität mit Hilfe eines videomikroskopischen Systems aufzuzeichnen. Untersucht wurde der Einfluss einer passageren Temperaturveränderung auf die KSF und die Transportgeschwindigkeit von Dynabeads (PTG) in der Trachea von Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass Temperaturveränderungen einen reversiblen und wiederholbaren Einfluss auf die KSF und PTG ausüben. Die beobachteten temperaturabhängigen Veränderungen der KSF bzw. PTG zeigten dabei eine Abhängigkeit von der Temperaturdifferenz. Während passagere Temperaturerhöhungen von 30 °C auf 34 °C und 37 °C zu einer Steigerung der PTG führten, wurden die maximalen PTG und KSF bei einer Temperatur von 41 °C gemessen. Die passagere Temperaturniedrigung auf 22 °C dagegen führte zu einem funktionellen Stillstand des Partikeltransports, die in der Messung minimaler KSF resultierte. Im untersuchten Temperaturintervall zeigte sich dabei ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen Temperatur und der ziliären Transportleistung.

Unter Verwendung von Ca^{2+} -freier HEPES-Ringer-Pufferlösung und zusätzlicher Applikation von BAPTA/AM und EGTA wurde ferner die Bedeutung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen bei der Regulation der ziliären Grundaktivität und der Vermittlung temperaturabhängiger Veränderungen der PTG untersucht. Die Applikation von BAPTA/AM zeigte sich dabei ohne Auswirkung auf die ziliäre Grundaktivität und den zuvor festgestellten reversiblen und wiederholbaren Effekt einer passageren einmaligen

oder zweimaligen Veränderung der Versuchstemperatur auf die PTG. Diese Beobachtungen liefern Hinweise auf eine mögliche Unabhängigkeit in der Aufrechterhaltung der ziliären Grundaktivität und der Vermittlung temperaturabhängiger Veränderungen der PTG von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen. Die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen konnten letztendlich jedoch nicht abschließend geklärt werden. Klarheit könnten Versuche mit zusätzlicher Blockade cAMP- und cGMP-abhängiger Signalkaskaden oder der zusätzlichen Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher im Rahmen von zukünftigen Forschungsprojekten schaffen.

6 Summary

The mucociliary clearance protects the respiratory system from inhaled pathogens. Its main determining factor is the ciliary beat frequency (cbf). The cbf depends on multiple parameters and ciliary beating can be enhanced in response to varying environmental conditions. Consequently, the ciliary machinery can function in at least two different modes, which include a low and a high rate of beating. The molecular mechanisms responsible for the regulation of these two modes of ciliary activity are complex and controversially discussed in the published literature. However, it is widely accepted that intracellular Ca^{2+} -ions are crucially involved in the control of ciliary beating in most species. While for instance the effect of ATP on the ciliary beating is widely investigated, the regulation of spontaneous ciliary beating as well as the effect of temperature on the ciliary system and the underlying cellular mechanisms remain unclear.

In this work, the ciliary activity was investigated *ex vivo* by measuring the cbf and the transport rate of defined particles (Dynabeads) in the trachea of mice, using a videomicroscopic system. Temporary changes in temperature in this study had a reversible and repeatable effect on both cbf and ciliary particle transport (cpt). Moreover, the temperature-related changes in cbf and cpt were depending on the difference in temperature. Whereas temporary changes in temperature from 30 °C to 34 °C and 30 °C to 37 °C raised cpt, the maximum cpt and cbf were measured at temperatures as high as 41 °C. In contrast, the temporary reduction of the surrounding temperature to 22 °C resulted in a stagnancy of cpt with minimal cbf. In the studied temperatures a quasilinear correlation between temperature and ciliary transport was found.

Using a Ca^{2+} -free HEPES buffering agent and additional application of BAPTA/AM and EGTA, the role of intracellular Ca^{2+} -ions in the regulation of spontaneous ciliary beating and the coordination of temperature-depending changes in cpt were investigated. It was found that the application of BAPTA/AM had no influence neither on spontaneous cbf nor on the reversible and repeatable correlation between temperature and ciliary transport shown before. This data provides indication for a possible independency of basal cbf and temperature-related changes in ciliary activity from intracellular Ca^{2+} -ions. However, the underlying cellular mechanisms could not be conclusively resolved. Further investigation will be necessary to resolve this issue. For example, experiments with additional blockage of cAMP- and cGMP-depending signaling cascades or the additional emptying of the intracellular calcium stores could be carried out.

7 Abkürzungsverzeichnis

A

Acetylcholin	ACh
Adenosintriphosphat	ATP
Area of interest	AOI
Adenylyl-Zyklasten	AC
membranständigen Adenylyl Zyklasten	mAC
lösliche Adenylyl Zyklasten	sAC
A-kinase-anchoring-protein	AKAP

C

Calcium-Calmodulin	Ca-CaM
Calciumionen	Ca ²⁺ -Ionen
Calciumkonzentration intrazellulär	[Ca ²⁺] _i
Calmodulin	CaM
Ciliary beat frequency	cbf
Ciliary particle transport	cpt

D

Delta-T-Kulturschälchen	T-Dish
Diacylglycerol	DAG
Dimethylsulfoxid	DMSO

E

Ethylendiamintetraessigsäure	EGTA
------------------------------	------

I

Inositol-1,4,5-Triphosphat	IP3
----------------------------	-----

K

Kinozilenschlagfrequenz	KSF
-------------------------	-----

M

Mittelwert	MW
------------	----

P

Partikeltransportgeschwindigkeit	PTG
pH intrazellulär	pH _i
Phospholipase C	PLC
Proteinkinase C	PKC

Proteinkinase G	PKG
S	
Standardabweichung	SD
Stickstoffmonoxid	NO
Stickstoffmonoxid-Synthase	NOS
V	
Versuche zur KSF mit passagerer Veränderung der Versuchstemperatur auf 22 °C	V-22 °C
Versuche zur KSF mit passagerer Veränderung der Versuchstemperatur auf 41 °C	V-41 °C
Versuche zur PTG mit passagerer Veränderung der Versuchstemperatur auf 26 °C	V-26 °C
Versuche zur PTG mit passagerer Veränderung der Versuchstemperatur auf 34 °C	V-34 °C
Versuche zur PTG mit passagerer Veränderung der Versuchstemperatur auf 37 °C	V-37 °C
Versuche zur PTG mit passagerer einmaliger Veränderung der Versuchstemperatur auf 41 °C	V ₁ -41 °C
Versuche zur PTG mit passagerer zweimaliger Veränderung der Versuchstemperatur auf 41 °C	V ₂ -41 °C
Versuche zur PTG mit passagerer einmaliger Veränderung der Versuchstemperatur auf 41 °C und Applikation von BAPTA/AM und EGTA	V _{1B} -41 °C
Versuche zur PTG mit passagerer einmaliger Veränderung der Versuchstemperatur auf 41 °C Und Applikation von BAPTA/AM und EGTA	V _{2B} -41 °C
Z	
Zyklisches Adenosimonophosphat	cAMP
Zyklisches Guanosinmonophosphat	cGMP

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Tunica mucosa des Trachealepithels (Wanner et al. 1996).....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus des Trachealsekrets (Houtmeyers et al. 1999).....	11
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung (3000-fache Vergrößerung) von Kinozilien (K) im Trachealepithel von Hasen (Sanderson et al. 1981).	11
Abbildung 4: Schematischer (links) und elektronenmikroskopischer (rechts) Aufbau einer Kinozilie in den Atemwegen im Querschnitt mit klassischer „9+2-Struktur“ (Lee et al. 2011).	12
Abbildung 5: Axonem (axoneme) einer Kinozilie im Längsschnitt (Eley et al. 2005) ..	15
Abbildung 6: Der Schlagzyklus einer Kinozilie von oben (top) und von der Seite (side) dargestellt (Sleigh et al. 1988).....	18
Abbildung 7: Dargestellt ist der Transport von Mukus (m) über Arealen mit aktiven Kinozilien (p) des Flimmerepithels (e, Sleigh et al. 1988).	20
Abbildung 8: Steuerung der KSF.	35
Abbildung 9: Versuchsstand	42
Abbildung 10: Vergleichende Darstellung der PTG bei konstanter Temperatur von 30 °C (Kontrollversuche n = 3) mit und ohne Zugabe von DMSO (10 mM, n = 3).....	44
Abbildung 11: Versuchsschema.....	49
Abbildung 12: Vergleichende Darstellung der KSF bei konstanter Temperatur von 30 °C (Kontrollversuche, n = 5) und einer passageren Veränderung der Versuchstemperatur auf 22 °C (A, n = 4) bzw. 41 °C (B, n = 4) im Messintervall zwischen Minute 60 und 72.	54
Abbildung 13: Vergleichende Darstellung der PTG bei konstanter Temperatur von 30 °C (Kontrollversuche, n = 6) und einer passageren Veränderung der Versuchstemperatur auf 26 °C (A, n = 5), 34 °C (B, n = 3) bzw. 37 °C (C, n = 4) im Messintervall zwischen Minute 60 und 72.....	59
Abbildung 14: Vergleichende Darstellung der PTG bei konstanter Temperatur von 30 °C (Kontrollversuche, n = 6) und einer passageren einmaligen (A, n = 4) bzw. zweimaligen (B, n = 3) Veränderung der Versuchstemperatur auf 41 °C im Messintervall zwischen Minute 60 und 90.....	61
Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der PTG bei konstanter Temperatur von 30 °C (Kontrollversuche n = 3) mit und ohne Applikation von BAPTA/AM (10 µM, Minute 60).	62
Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der PTG mit bzw. ohne Applikation von BAPTA/AM (10 µM, Minute 60) und zusätzlicher einmaliger (A) bzw. zweimaliger (B) passagerer Erhöhung der Versuchstemperatur auf 41 °C.	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ist-Temperatur im Medium bei Temperaturerhöhung:	43
Tabelle 2: Ist-Temperatur im Medium bei Temperaturerniedrigung:	43

9 Literaturverzeichnis

Aiello E, Sleight MA: The metachronal wave of lateral cilia of *Mytilus edulis*. *J Cell Biol* 54: 493–506, 1972.

Alexander I, Ritchie BC, Maloney JE, Hunter CR: Epithelial surfaces of the trachea and principal bronchi in the rat. *Thorax* 30: 171–177, 1975.

Andersen I, Lundqvist GR, Proctor DF: Human nasal mucosal function in a controlled climate. *Arch Environ Health* 23: 408–420, 1971.

Andrade YN, Fernandes J, Vázquez E, Fernández-Fernández JM, Arniges M, Sánchez TM, Villalón M, Valverde MA: TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity. *J Cell Biol* 168: 869–874, 2005.

Berridge MJ: Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315–325, 1993.

Blouin JL, Meeks M, Radhakrishna U, Sainsbury A, Gehring C, Saïl GD, Bartoloni L, Dombi V, O’Rawe A, Walne A, Chung E, Afzelius BA, Armengot M, Jorissen M, Schidlow DV, van Maldergem L, Walt H, Gardiner RM, Probst D, Guerne PA, Delozier-Blanchet CD, Antonarakis SE: Primary ciliary dyskinesia: A genome-wide linkage analysis reveals extensive locus heterogeneity. *Eur J Hum Genet* 8: 109–118, 2000.

Boat TF, Cheng P, Leigh MW: Biochemistry of Mucus. In: Takishima T, Shimura S, eds. *Airway Secretion: Physiological bases for the control of mucus hypersecretion*, vol 72 of lung biology in health and disease. New York: Marcel Dekker, 217–282, 1994.

Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P: Calcium signaling - an overview. *Semin Cell Dev Biol* 12: 3–10, 2001.

Braiman A, Priel Z: Efficient mucociliary transport relies on efficient regulation of ciliary beating. *Respir Physiol Neurobiol* 163: 202–207, 2008.

Braiman A, Silberberg SD, Priel Z: Purinergic stimulation of ciliary activity. *Drug Dev Res* 50: 550–554, 2000a.

Braiman A, Uzlaner N, Priel Z: The role of cyclic nucleotide pathways and calmodulin in ciliary stimulation. In: IMA volumes in mathematics and its applications. Berlin: Springer-Verlag, 53-64, 2000b.

Braiman A, Zagoory O, Priel Z: PKA induces Ca^{2+} release and enhances ciliary beat frequency in a Ca^{2+} -dependent and -independent manner. *Am J Physiol* 275: C 790–797, 1998.

Burn JH: Acetylcholine as a local hormone for ciliary movement and the heart. *Pharmacol Rev* 6: 107–112, 1954.

Calliburces P : Recherches experimentales sur l'influence exercee par la haleur sur les manifestations de la contractilite des organes. *Comptes rendus* vol 47: 638, 1858.

Cervin A, Lindberg S, Mercke U: The effect of neuropeptide Y on mucociliary activity in the rabbit maxillary sinus. *Acta Otolaryngol* 111: 960–966, 1991.

Chilcote TJ, Johnson KA: Phosphorylation of Tetrahymena 22 S dynein. *J Biol Chem* 265: 17257–17266, 1990.

Chilvers MA, O'Callaghan C: Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev* 1: 27–34, 2000.

Chilvers MA, Rutman A, O'Callaghan C: Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *J Allergy Clin Immunol* 112: 518–524, 2003.

Clary-Meinesz C, Mouroux J, Cosson J, Huitorel P, Blaive B: Influence of external pH on ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles. *Eur Respir J* 11: 330–333, 1998.

Connolly TP, Noujaim AA, Man SF: Simultaneous canine tracheal transport of different particles. *Am Rev Respir Dis* 118: 965–968, 1978.

Corssen G, Allen CR: Acetylcholine: Its significance in controlling ciliary activity of human respiratory epithelium in vitro. *J Appl Physiol* 14: 901–904, 1959.

De Jong PM, van Sterkenburg MA, Hesseling SC, Kempenaar JA, Mulder AA, Mommaas AM, Dijkman JH, Ponc M: Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 271–277, 1994.

Dentler WL, Pratt MM, Stephens RE: Microtubule-membrane interactions in cilia. II. Photochemical cross-linking of bridge structures and the identification of a membrane-associated dynein-like ATPase. *J Cell Biol* 84: 381–403, 1980.

Di Benedetto G, Magnus CJ, Gray PT, Mehta A: Calcium regulation of ciliary beat frequency in human respiratory epithelium in vitro. *J Physiol (Lond)* 439: 103–113, 1991.

Dirksen ER, Sanderson MJ: Regulation of ciliary activity in the mammalian respiratory tract. *Biorheology* 27: 533–545, 1990.

Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA: Calcium in cell injury and death. *Annu Rev Pathol* 1: 405–434, 2006.

Drenckhahn D, Waschke J, Hrsg.: Kapitel Zellenlehre. In: Benninghoff Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. 16. Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 1: 9-91, 2003.

Dymek EE, Smith EF: A conserved CaM- and radial spoke associated complex mediates regulation of flagellar dynein activity. *J Cell Biol* 179: 515–526, 2007.

Eley L, Yates LM, Goodship JA: Cilia and disease. *Curr Opin Genet Dev* 15: 308–314, 2005.

Eshel D, Priel Z: Spectral characterization of ciliary beating. Temperature dependence on spectral parameters. *Biophys Chem* 25: 215–222, 1986.

Eshel D, Priel Z: Characterization of metachronal wave of beating cilia on frog's palate epithelium in tissue culture. *J Physiol (Lond)* 388: 1–8, 1987.

Evans JH, Sanderson MJ: Intracellular calcium oscillations regulate ciliary beat frequency of airway epithelial cells. *Cell Calcium* 26: 103–110, 1999.

Fisch C, Dupuis-Williams P: Ultrastructure of cilia and flagella - back to the future! *Biol Cell* 103: 249–270, 2011.

Foster WM, Walters DM, Longphre M, Macri K, Miller LM: Methodology for the measurement of mucociliary function in the mouse by scintigraphy. *J Appl Physiol* 90: 1111–1117, 2001.

Gardner LC, O'Toole E, Perrone CA, Giddings T, Porter ME: Components of a “dynein regulatory complex” are located at the junction between the radial spokes and the dynein arms in *Chlamydomonas* flagella. *J Cell Biol* 127: 1311–1325, 1994.

Geary CA, Davis CW, Paradiso AM, Boucher RC: Role of CNP in human airways: cGMP-mediated stimulation of ciliary beat frequency. *Am J Physiol* 268: L 1021–1028, 1995.

Gehr P, Green FH, Geiser M, Im Hof V, Lee MM, Schürch S: Airway surfactant, a primary defense barrier: Mechanical and immunological aspects. *J Aerosol Med* 9: 163–181, 1996.

Gheber L, Korngreen A, Priel Z: Effect of viscosity on metachrony in mucus propelling cilia. *Cell Motil Cytoskeleton* 39: 9–20, 1998.

Gheber L, Priel Z: Synchronization between beating cilia. *Biophys J* 55: 183–191, 1989.

Gnegy ME: Calmodulin in neurotransmitter and hormone action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 45–70, 1993.

Goodman RM, Yergin BM, Landa JF, Golivanux MH, Sackner MA: Relationship of smoking history and pulmonary function tests to tracheal mucous velocity in nonsmokers, young smokers, ex-smokers and patients with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 117: 205–214, 1978.

Gordon RE, Williams KB, Puskin S: Immune localization of calmodulin in the ciliated cells of hamster tracheal epithelium. *J Cell Biol* 95: 57–63, 1982.

Groth ML, Langenback EG, Foster WM: Influence of inhaled atropine on lung mucociliary function in humans. *Am Rev Respir Dis* 144: 1042–1047, 1991.

Hamasaki T, Barkalow K, Richmond J, Satir P: cAMP-stimulated phosphorylation of an axonemal polypeptide that copurifies with the 22S dynein arm regulates microtubule translocation velocity and swimming speed in *Paramecium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7918–7922, 1991.

Hasani A, Vora H, Pavia D, Agnew JE, Clarke SW: No effect of gender on lung mucociliary clearance in young healthy adults. *Respir Med* 88: 697–700, 1994.

Harper P, Andros G, Lathrop KA: Preliminary observations on the use of the six-hours 99m-Techetium as a tracer in biology and medicine. *AH*, 18: 76, 1962.

Hayashi T, Kawakami M, Sasaki S, Katsumata T, Mori H, Yoshida H, Nakahari T: ATP regulation of ciliary beat frequency in rat tracheal and distal airway epithelium. *Exp Physiol* 90: 535–544, 2005.

Hilding A: Ciliary activity and course of secretion currents in the nose. *Proc Mayo Clin* 6: 825, 1931.

Hirano-Ohnishi J, Watanabe Y: Ca^{2+} /Calmodulin-dependent phosphorylation of ciliary beta-tubulin in Tetrahymena. *J Biochem* 105: 858–860, 1989.

Hochstrasser M, Carlson GL, Walczak CE, Nelson DL: Paramecium has two regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase, one unique to cilia. *J Eukaryot Microbiol* 43: 356–362, 1996.

Holwill ME: Dynein motor activity during ciliary beating. In: Salathe M, ed. *Cilia and Mucus: From development to respiratory disease*. New York: Marcel Dekker; pp. 19-25, 2001.

Homolya L, Steinberg TH, Boucher RC: Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. *J Cell Biol* 150: 1349–1360, 2000.

Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M: Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur Respir J* 13: 1177–1188, 1999.

Howard DR, Habermacher G, Glass DB, Smith EF, Sale WS: Regulation of Chlamydomonas flagellar dynein by an axonemal protein kinase. *J Cell Biol* 127: 1683–1692, 1994.

Humphries S: A physical explanation of the temperature dependence of physiological processes mediated by cilia and flagella. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 14693–14698, 2013.

Irvani J: Flimmerbewegung in den intrapulmonalen Luftwegen der Ratte. *Pflugers Arch* 297: 221-37, 1967.

Johnson NT, Villalón M, Royce FH, Hard R, Verdugo P: Autoregulation of beat frequency in respiratory ciliated cells. Demonstration by viscous loading. *Am Rev Respir Dis* 144: 1091–1094, 1991.

Jorissen M, Bessems A: Normal ciliary beat frequency after ciliogenesis in nasal epithelial cells cultured sequentially as monolayer and in suspension. *Acta Otolaryngol* 115: 66–70, 1995.

Jorissen M, Van der Schueren B, Van den Berghe H, Cassiman JJ: Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. *Eur Respir J* 4: 210–217, 1991.

Kakuta Y, Kanno T, Sasaki H, Takishima T: Effect of Ca^{2+} on the ciliary beat frequency of skinned dog tracheal epithelium. *Respir Physiol* 60: 9–19, 1985.

Kennedy JR, Duckett KE: The study of ciliary frequencies with an optical spectrum analysis system. *Exp Cell Res* 135: 147–156, 1981.

Keskes L, Giroux-Widemann V, Serres C, Pignot-Paintrand I, Jouannet P, Feneux D: The reactivation of demembranated human spermatozoa lacking outer dynein arms is independent of pH. *Mol Reprod Dev* 49: 416–425, 1998.

Kienast K, Knorst M, Riechelmann H, Schellenberg J, Müller-Quernheim J, Ferlinz R: In vitro studies of the beat frequency of ciliary cell cultures after short-term exposure to SO_2 and NO_2 . *Med Klin (Munich)* 88: 520–524, 1993.

Kienast K, Riechelmann H, Knorst M, Schlegel J, Müller-Quernheim J, Schellenberg J, Ferlinz R: An experimental model for the exposure of human ciliated cells to sulfur dioxide at different concentrations. *Clin Investig* 72: 215–219, 1994.

Kilgour E, Rankin N, Ryan S, Pack R: Mucociliary function deteriorates in the clinical range of inspired air temperature and humidity. *Intensive Care Med* 30: 1491–1494, 2004.

Kim KC, McCracken K, Lee BC, Shin CY, Jo MJ, Lee CJ, Ko KH: Airway goblet cell mucin: Its structure and regulation of secretion. *Eur Respir J* 10: 2644–2649, 1997.

King M, Gilboa A, Meyer FA, Silberberg A: On the transport of mucus and its rheologic simulants in ciliated systems. *Am Rev Respir Dis* 110: 740–745, 1974.

King M, Zahm JM, Pierrot D, Vaquez-Girod S, Puchelle E: The role of mucus gel viscosity, spinnability and adhesive properties in clearance by simulated cough. *Biorheology* 26: 737–745, 1989.

Klein MK, Haberberger RV, Hartmann P, Faulhammer P, Lips KS, Krain B, Wess J, Kummer W, König P: Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. *Eur Respir J* 33: 1113–1121, 2009.

Knowles MR, Boucher RC: Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 109: 571–577, 2002.

Kobayashi K, Salathé M, Pratt MM, Cartagena NJ, Soloni F, Seybold ZV, Wanner A: Mechanism of hydrogen peroxide-induced inhibition of sheep airway cilia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6: 667–673, 1992.

König P, Krain B, Krasteva G, Kummer W: Serotonin increases cilia-driven particle transport via an acetylcholine-independent pathway in the mouse trachea. *PLoS One* 4 (3): e4938, 2009.

Korngreen A, Ma W, Priel Z, Silberberg SD: Extracellular ATP directly gates a cation-selective channel in rabbit airway ciliated epithelial cells. *J Physiol (Lond)* 508 (Pt 3): 703–720, 1998.

Korngreen A, Priel Z: Simultaneous measurement of ciliary beating and intracellular calcium. *Biophys J* 67: 377–380, 1994.

Korngreen A, Priel Z: Purinergic stimulation of rabbit ciliated airway epithelia: Control by multiple calcium sources. *J Physiol (Lond)* 497 (Pt 1): 53–66, 1996.

Kubo A, Yuba-Kubo A, Tsukita S, Tsukita S, Amagai M: Sentan: A novel specific component of the apical structure of vertebrate motile cilia. *Mol Biol Cell* 19: 5338–5346, 2008.

Kultgen PL, Byrd SK, Ostrowski LE, Milgram SL: Characterization of an A-kinase anchoring protein in human ciliary axonemes. *Mol Biol Cell* 13: 4156–4166, 2002.

Kummer W, Wiegand S, Akinci S, Schinkel AH, Wess J, Koepsell H, Haberberger RV, Lips KS: Role of acetylcholine and muscarinic receptors in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. *J Mol Neurosci* 30: 67–68, 2006.

Lamblin G, Aubert JP, Perini JM, Klein A, Porchet N, Degand P, Roussel P: Human respiratory mucins. *Eur Respir J* 5: 247–256, 1992.

Lansley AB, Sanderson MJ: Regulation of airway ciliary activity by Ca^{2+} : Simultaneous measurement of beat frequency and intracellular Ca^{2+} . *Biophys J* 77: 629–638, 1999.

Lansley AB, Sanderson MJ, Dirksen ER: Control of the beat cycle of respiratory tract cilia by Ca^{2+} and cAMP. *Am J Physiol* 263: L 232–242, 1992.

Lee CH, Lee SS, Mo J-H, Kim I-S, Quan S-H, Wang SY, Yi W-J, Rhee C-S, Min Y-G: Comparison of ciliary wave disorders measured by image analysis and electron microscopy. *Acta Otolaryngol* 125: 571–576, 2005.

Lee L: Mechanisms of mammalian ciliary motility: Insights from primary ciliary dyskinesia genetics. *Gene* 473: 57–66, 2011.

Lee RJ, Foskett JK: Ca^{2+} signaling and fluid secretion by secretory cells of the airway epithelium. *Cell Calcium* 55: 325–336, 2014.

Manalan AS, Klee CB: Calmodulin. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 18: 227–278, 1984.

Ma W, Silberberg SD, Priel Z: Distinct axonemal processes underlie spontaneous and stimulated airway ciliary activity. *J Gen Physiol* 120: 875–885, 2002.

McDonald LJ, Murad F: Nitric oxide and cGMP signaling. *Adv Pharmacol* 34: 263–275, 1995.

Mercke U, Hakansson CH, Toremalm NG: The influence of temperature on mucociliary activity. Temperature range 20 degrees C–40 degrees C. *Acta Otolaryngol* 78: 444–450, 1974.

Morse DM, Smullen JL, Davis CW: Differential effects of UTP, ATP and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells. *Am J Physiol, Cell Physiol* 280: C 1485–1497, 2001.

Mwimbi XKMS, Muimo R, Green MW, Mehta A: Making human nasal cilia beat in the cold: A real time assay for cell signalling. *Cell Signal* 15: 395–402, 2003.

Naito Y, Kaneko H: Reactivated triton-extracted models of paramecium: Modification of ciliary movement by calcium ions. *Science* 176: 523–524, 1972.

Nishizuka Y: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334: 661–665, 1988.

O’Callaghan C, Achaval M, Forsythe I, Barry PW: Brain and respiratory cilia: The effect of temperature. *Biol Neonate* 68: 394–397, 1995.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P: Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 552–565, 2003.

Ovadyahu D, Eshel D, Priel Z: Intensification of ciliary motility by extracellular ATP. *Biorheology* 25: 489–501, 1988.

Paradiso AM, Cheng EH, Boucher RC: Effects of bradykinin on intracellular calcium regulation in human ciliated airway epithelium. *Am J Physiol* 261: L 63–69, 1991.

Pavia D: Lung mucociliary clearance. In: Clarke SW, Pavia D, eds. *Aerosols in the lung: Clinical and experimental aspects*. London: Butterworth, 127–155, 1984.

Picher M, Boucher R: Metabolism of extracellular nucleotides in human airways by a multienzyme system. *Drug Dev Res* 52: 66–75, 2001.

Porter ME, Sale WS: The 9+2-axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *J Cell Biol* 151: F 37–42, 2000.

Proctor DF, Wagner HN: Clearance of particles from the human nose. Preliminary report. *Arch Environ Health* 11: 366–371, 1965.

Proetz AW: Effect of temperature on nasal cilia. *Arch Otolaryngol* 19 (5): 607–609, 1934.

Rasmussen H, Rasmussen JE: Calcium as intracellular messenger: From simplicity to complexity. *Curr Top Cell Regul* 31: 1–109, 1990.

Rautiainen M, Matsune S, Yoshitsugu M, Ohyama M: Degeneration of human respiratory cell ciliary beat in monolayer cell cultures. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 250: 97–100, 1993.

Robinson NP, Kyle H, Webber SE, Widdicombe JG: Electrolyte and other chemical concentrations in tracheal airway surface liquid and mucus. *J Appl Physiol* 66: 2129–2135, 1989.

Rusznak C, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ: Circadian rhythms in ciliary beat frequency of human bronchial epithelial cells, in vitro. *Respir Med* 88: 461–463, 1994.

Salathe M: Regulation of mammalian ciliary beating. *Annu Rev Physiol* 69: 401–422, 2007.

Salathe M, Bookman RJ: Coupling of $[Ca^{2+}]_i$ and ciliary beating in cultured tracheal epithelial cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 2): 431–440, 1995.

Salathe M, Bookman RJ: Mode of Ca^{2+} action on ciliary beat frequency in single ovine airway epithelial cells. *J Physiol (Lond)* 520 (Pt 3): 851–865, 1999.

Salathe M, Lipson EJ, Ivonnet PI, Bookman RJ: Muscarinic signaling in ciliated tracheal epithelial cells: Dual effects on Ca^{2+} and ciliary beating. *Am J Physiol* 272: L 301–310, 1997.

Salathe M, Pratt MM, Wanner A: Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a 26 kD axonemal protein in ovine cilia isolated from small tissue pieces. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 306–314, 1993a.

Salathe M, Pratt MM, Wanner A: Protein kinase C-dependent phosphorylation of a ciliary membrane protein and inhibition of ciliary beating. *J Cell Sci* 106 (Pt 4): 1211–1220, 1993b.

Sanderson MJ, Charles AC, Dirksen ER: Mechanical stimulation and intercellular communication increases intracellular Ca^{2+} in epithelial cells. *Cell Regul* 1: 585–596, 1990.

Sanderson MJ, Dirksen ER: A versatile and quantitative computer-assisted photoelectronic technique used for the analysis of ciliary beat cycles. *Cell Motil* 5: 267–292, 1985.

Sanderson MJ, Dirksen ER: Mechanosensitive and beta-adrenergic control of the ciliary beat frequency of mammalian respiratory tract cells in culture. *Am Rev Respir Dis* 139: 432–440, 1989.

Sanderson MJ, Sleight MA: Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: Beat pattern and metachrony. *J Cell Sci* 47: 331–347, 1981.

Satir P, Christensen ST: Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 69: 377–400, 2007.

Satir P, Christensen ST: Structure and function of mammalian cilia. *Histochem Cell Biol* 129: 687–693, 2008.

Satir P, Matsuoka T: Splitting the ciliary axoneme: Implications for a “switch-point” model of dynein arm activity in ciliary motion. *Cell Motil Cytoskeleton* 14: 345–358, 1989.

Satir P, Sleight MA: The physiology of cilia and mucociliary interactions. *Annu Rev Physiol* 52: 137–155, 1990.

Schlosser RJ, Czaja JM, Yang B, McCaffrey TV: Signal transduction mechanisms in substance P-mediated ciliostimulation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 113: 582–588, 1995.

Schmid A, Salathe M: Ciliary beat co-ordination by calcium. *Biol Cell* 103: 159–169, 2011.

Schmid A, Sutto Z, Nlend M-C, Horvath G, Schmid N, Buck J, Levin LR, Conner GE, Fregien N, Salathe M: Soluble adenylyl cyclase is localized to cilia and contributes to ciliary beat frequency regulation via production of cAMP. *J Gen Physiol* 130: 99–109, 2007.

Schmidt HH, Walter U: NO at work. *Cell* 78: 919–925, 1994.

Serafini SM, Michaelson ED: Length and distribution of cilia in human and canine airways. *Bull Eur Physiopathol Respir* 13: 551–559, 1977.

Seybold ZV, Mariassy AT, Stroh D, Kim CS, Gazeroglu H, Wanner A: Mucociliary interaction in vitro: Effects of physiological and inflammatory stimuli. *J Appl Physiol* 68: 1421–1426, 1990.

Sleigh MA, Blake JR, Liron N: The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis* 137: 726–741, 1988.

Smith DJ, Gaffney EA, Blake JR: Modelling mucociliary clearance. *Respir Physiol Neurobiol* 163: 178–188, 2008.

Smith CM, Hirst RA, Bankart MJ, Jones DW, Easton AJ, Andrew PW, O'Callaghan C: Cooling of cilia allows functional analysis of the beat pattern for diagnostic testing. *Chest* 140 (1): 186-90, 2011.

Spungin B, Silberberg A: Stimulation of mucus secretion, ciliary activity and transport in frog palate epithelium. *Am J Physiol* 247: C 299–308, 1984.

Stuehr DJ, Santolini J, Wang Z-Q, Wei C-C, Adak S: Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem* 279: 36167–36170, 2004.

Sutto Z, Conner GE, Salathe M: Regulation of human airway ciliary beat frequency by intracellular pH. *J Physiol (Lond)* 560: 519–532, 2004.

Svartengren M, Mossberg B, Philipson K, Camner P: Mucociliary clearance in relation to clinical features in patients with bronchiectasis. *Eur J Respir Dis* 68: 267–278, 1986.

Tamaoki J, Kobayashi K, Sakai N, Kanemura T, Horii S, Isono K, Takeuchi S, Chiyotani A, Yamawaki I, Takizawa T: Atrial natriuretic factor inhibits ciliary motility in cultured rabbit tracheal epithelium. *Am J Physiol* 260: C 201–205, 1991.

Tremble GE: Clinical observations on the movement of nasal cilia; an experimental study. *Laryngoscope* 58: 206–224, 1948.

Trindade SHK, de Mello JF, Mion O, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Guimarães ET, Saldiva PHN: Methods for studying mucociliary transport. *Braz J Otorhinolaryngol* 73: 704–712, 2007.

Uzlaner N, Priel Z: Interplay between the NO pathway and elevated $[Ca^{2+}]_i$ enhances ciliary activity in rabbit trachea. *J Physiol (Lond)* 516 (Pt 1): 179–190, 1999.

Verdugo P: Ca^{2+} -dependent hormonal stimulation of ciliary activity. *Nature* 283: 764–765, 1980.

Verdugo P: Mucin exocytosis. *Am Rev Respir Dis* 144: S 33–37, 1991.

Villalón M, Hinds TR, Verdugo P: Stimulus-response coupling in mammalian ciliated cells. Demonstration of two mechanisms of control for cytosolic $[Ca^{2+}]$. *Biophys J* 56: 1255–1258, 1989.

Wanner A, Salathe M, O’Riordan TG: Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1868–1902, 1996.

Weiterer S, Schulte D, Müller S, Kohlen T, Uhle F, Weigand MA, Henrich M. Tumor necrosis factor alpha induces a serotonin dependent early increase in ciliary beat frequency and epithelial transport velocity in murine tracheae. *PLoS One*. 9(3): 6-9, 2014.

Welsch U, Deller T, Hrsg.: Kapitel Atmungsorgane. In: Sobotta Lehrbuch Histologie. 2. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag, 278-280, 2003.

Whiteside ME, Lauredo I, Chapman GA, Ratzan KR, Abraham WM, Wanner A: Effect of atropine on tracheal mucociliary clearance and bacterial counts. *Bull Eur Physiopathol Respir* 20: 347–351, 1984.

Wolff RK, Dolovich MB, Obminski G, Newhouse MT: Effects of exercise and eucapnic hyperventilation on bronchial clearance in man. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 43: 46–50, 1977.

Wong LB, Miller IF, Yeates DB: Regulation of ciliary beat frequency by autonomic mechanisms: in vitro. *J Appl Physiol* 65: 1895–1901, 1988.

Wong LB, Park CL, Yeates DB: Neuropeptide Y inhibits ciliary beat frequency in human ciliated cells via nPKC, independently of PKA. *Am J Physiol* 275: C 440–448, 1998.

Wyatt TA, Spurzem JR, May K, Sisson JH: Regulation of ciliary beat frequency by both PKA and PKG in bovine airway epithelial cells. *Am J Physiol* 275: L 827–835, 1998.

Yager J, Chen TM, Dulfano MJ: Measurement of frequency of ciliary beats of human respiratory epithelium. *Chest* 73: 627–633, 1978.

Yoneda K: Mucous blanket of rat bronchus: An ultrastructural study. *Am Rev Respir Dis* 114: 837–842, 1976.

Zagoory O, Braiman A, Gheber L, Priel Z: Role of calcium and calmodulin in ciliary stimulation induced by acetylcholine. *Am J Physiol Cell Physiol* 280 (1): C 100-9, 2001.

Zagoory O, Braiman A, Priel Z: The mechanism of ciliary stimulation by acetylcholine: Roles of calcium PKA and PKG. *J Gen Physiol* 119: 329–339, 2002.

Zhang L, Han D-M, Wang H, Zhou B, Sanderson MJ: Measurement of respiratory ciliary beat frequency quantified with high-speed digital microscopy. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 39: 433–437, 2004.

Zhang L, Sanderson MJ: Oscillations in ciliary beat frequency and intracellular calcium concentration in rabbit tracheal epithelial cells induced by ATP. *J Physiol (Lond)* 546: 733–749, 2003a.

Zhang L, Sanderson MJ: The role of cGMP in the regulation of rabbit airway ciliary beat frequency. *J Physiol (Lond)* 551: 765–776, 2003b.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Henrich, D. Phil. für die Überlassung des Themas, sein besonderes Interesse und die sehr hilfreiche und trotz der großen Arbeitsbelastung engagierte Betreuung danken.

Herrn Prof. Dr. Heiss danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Sebastian Weiterer danke ich für seine hervorragende theoretische und praktische Einführung in das Thema und seine Hilfestellung vor allem während des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die nette Zusammenarbeit und die schöne Zeit. Im Speziellen danken möchte ich Florian Uhle, Ilona Magel und Petra Faulhammer für ihre praktische und theoretische Hilfestellung bei der Planung und Vorbereitung der Versuche.

Un grand merci à Robin. Merci pour ton aide avec les calculs statistiques et tes explications patientes.

Jan Rudolph danke ich für die hilfreichen Lösungsstrategien bei diversen Problemen mit Software- und Computerprogrammen.

Sans toi, Céline, ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Merci pour tes encouragements, tes idées constructives et ton aide. Merci pour ta compréhension et ta patience pendant tout ce temps. Je peux toujours compter sur toi. Je te remercie de tout mon cœur pour tout ce que tu fais pour moi.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Großeltern, meinen Eltern und meiner Schwester Sannah bedanken. Ihr habt mich immer in all meinen Vorhaben unterstützt. Auch bei der Anfertigung dieser Arbeit habt ihr mir stets die nötige Rückendeckung und Rückenwind gegeben. Dafür danke ich euch sehr.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6343-6



9 783835 196343 6